

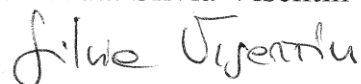
UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI UDINE

Corso di Dottorato di Ricerca in Scienze e Tecnologie Cliniche

Ciclo XXVI

**Programmazione fetale, ritardo di crescita  
intrauterino e funzionalità renale nelle gravidanze  
gemellari**

Dottoranda: Silvia Visentin



Relatore: Prof. Diego Marchesoni

**ANNO ACCADEMICO**

**2013/2014**

*“ Se ho visto più lontano  
è perché sono salito sulle spalle dei giganti  
che mi hanno preceduto..”  
(I. Newton)*

# **INDICE**

ABSTRACT	pag. 4-5
INTRODUZIONE	pag. 6-34
SCOPO DELLO STUDIO	pag. 33
MATERIALI E METODI	pag. 34-37
RISULTATI	pag. 38-45
DISCUSSIONE	pag. 46-49
BIBLIOGRAFIA	pag. 50-66

## ABSTRACT

**Background** Il ritardo di crescita intrauterino (IUGR) si può associare ad un aumento dello spessore intima medio aortico (aIMT). La gravidanza gemellare rappresenta un modello naturale di ritardo di crescita che consente di studiare una diversa espressione fenotipica fetale nel medesimo ambiente uterino. Una ridotta vascolarizzazione renale successiva a una redistribuzione del circolo può portare a un progressivo danno glomerulare che si evidenzia mediante il riscontro di proteinuria e microalbuminuria. NGAL (Neutrophil Gelatinose-Associated Lipocalin) è una glicoproteina espressa da neutrofili e diverse cellule epiteliali, con molteplici funzioni, immunitarie e di trasporto (prostaglandine, retinoidi, acido arachidonico, acidi grassi, steroidi, ferro e metalloproteinasi). La sua concentrazione aumenta in casi di infiammazione, infezione, patologie cardiache e renali. Non è noto se un aumentato spessore aortico si possa associare a glomerulosclerosi ed aumento delle concentrazioni amniotiche di microalbuminuria, ACR (rapporto creatinuria/albuminuria) ed NGAL in epoca prenatale nell'ambito delle gravidanze gemellari.

**Materiali e metodi** Si sono valutati aIMT, il rapporto ACR e la concentrazione di NGAL nel liquido amniotico di 197 pazienti gemellari afferite alla Clinica Ostetrica Ginecologica del Dipartimento della Salute della Donna e del Bambino dell'Università di Padova. I gemelli IUGR sono stati classificati in due gruppi: Gruppo A quelli con peso fetale stimato (EFW)  $< 10^{\circ}$  centile per epoca gestazionale con un indice di pulsatilità (PI) dell'arteria ombelicale (AO)  $> 2$  deviazioni standard (SD), mentre il Gruppo B quelli con un EFW  $< 10^{\circ}$  centile ma senza anomalie ecografiche flussimetriche. I gemelli di peso appropriato per epoca (AGA) (Gruppo C) presentavano un EFW tra il  $10^{\circ}$  e il  $90^{\circ}$  centile.

**Risultati** Lo spessore aIMT risultava significativamente differente all'interno dei tre gruppi (Gruppo A 0.88 mm, gruppo B 0.7 mm e Gruppo C 0.5 mm) ( $p < 0.0001$ ). In particolare, l'aIMT del Gruppo A era maggiore del Gruppo C ( $p < 0.0001$ ); l'aIMT del Gruppo B era maggiore rispetto al Gruppo C ( $p = 0.003$ ), ed era maggiore nel Gruppo A rispetto al Gruppo B ( $p < 0.05$ ). Il rapporto ACR si presentava in tal modo nei tre gruppi: Gruppo A 183,500 mg/g, Gruppo B 6,4720 mg/g e Gruppo C 8,2750 mg/g ( $p = 0.0002$ ). Risultava significativamente maggiore nel gruppo A rispetto al gruppo C ( $p = 0.03$ ) e rispetto al Gruppo B ( $p = 0.02$ ), rispettivamente.

La concentrazione del marcatore urinario NGAL risultava statisticamente differente nel Gruppo A (IUGR) (169,3 ng/mL) verso il Gruppo C (AGA) (158 ng/mL,  $p < 0,05$ ), mentre tra il Gruppo B (SGA) (128,4 ng/mL) ed AGA non si riscontravano differenze significative ( $p = 0.28$ ). Non esistevano differenze significative in merito alla concentrazione di sodio, potassio e cloro. Si era rilevata inoltre una correlazione negativa tra concentrazione di NGAL e volumi renali nel gruppo IUGR rispetto al gruppo AGA.

**Conclusioni** Feti gemelli con ritardo di crescita intrauterino ed alterazioni velocimetriche presentano un aumento dello spessore aIMT, della concentrazione amniotica di microalbuminuria, un aumentato rapporto ACR e di NGAL, possibili markers preclinici intrauterini di aterosclerosi e precoce glomerulosclerosi.

# INTRODUZIONE

## *Epidemiologia delle malattie cardiovascolari*

Le malattie cardiovascolari (CVD) rappresentano in tutti i paesi europei la maggiore causa di mortalità, morbidità ed ospedalizzazione, mentre in America, dove più di 13 milioni di persone ne sono affette per un costo di 150 bilioni di dollari l'anno, sono state causa nel 2004 della morte di 450000 persone<sup>1,2</sup>. In Europa la coronaropatia è attualmente la maggiore causa di morte, 1.92 milioni di persone, di cui 960000 tra il genere maschile e 963000 in quello femminile, con una diversa distribuzione nei diversi stati membri. Tali differenze vanno spiegate tenendo in considerazione tre caratteristiche: la collocazione geografica delle singole popolazioni, la modificazione delle condizioni di rischio associate allo stile di vita, e gli esiti associati alla gestione clinica degli eventi cardiovascolari<sup>3</sup>. Sebbene la manifestazione clinica sia principalmente acuta, le malattie cardiovascolari evolvono gradualmente e possono dare disabilità fisica e dipendenza per lungo tempo da terapie farmacologiche, condizionando la qualità di vita dei pazienti. The Healthy People 2010 Project (HP 2010), promosso dal governo americano, indica nella prevenzione, nell'attenta diagnosi, nel corretto management e nella prevenzione della ricorrenza i principali targets sui quali agire, in particolare mediante la riduzione del colesterolo totale, del fumo, della pressione arteriosa media, della glicemia, dell'eccessivo peso corporeo e dell'inattività fisica<sup>4</sup>.

### ***Ipotesi della programmazione fetale***

La recente scoperta che lo sviluppo di patologie croniche nell'età adulta trova fondamento in una curva di crescita ridotta od accelerata nel corso della vita fetale e dell'infanzia, ha portato alla formulazione di un nuovo modello di sviluppo per un gruppo di patologie quali la coronaropatia, lo stroke, l'ipertensione arteriosa e il diabete di tipo 2. Le dimensioni geografiche dello studio condotto nel 1947 in Inghilterra e nel Wales, basato su più di un milione di cadaveri deceduti per coronaropatia e su di un dettagliato registro relativo alla mortalità infantile, hanno consentito di valutare la presenza di una possibile associazione tra malattie cardiovascolari e specifiche patologie nel corso della vita intrauterina<sup>5</sup>. Molti altri studi quindi sono stati condotti su animali per comprovare il ruolo delle prime fasi dello sviluppo fetale sulla programmazione di alcune patologie dell'adulto<sup>6</sup>. Tale teoria, chiamata "Ipotesi di Barker" o "programmazione fetale" ha postulato una correlazione diretta tra basso peso alla nascita e CVD, rispondendo ad un concetto di plasticità di sviluppo, un periodo critico nel corso del quale un sistema risulta sensibile agli stimoli nutrizionali, ormonali e metabolici in cui si sviluppa. Per molti organi e sistemi il periodo critico si verifica in utero e può essere responsabile di una vasta gamma di manifestazioni fisiologiche o morfologiche nel corso dello sviluppo<sup>7,8</sup>.

Secondo Mallanby, che studiava la correlazione esistente tra scorretta alimentazione e lo sviluppo di alcune patologie, come ad esempio il rachitismo, l'abilità di una madre di nutrire la propria prole risulta parzialmente determinata dall'esperienza avuta da lei stessa in utero, nel corso dell'infanzia e dell'adolescenza, ad indicare come gli effetti sembrano ripercuotersi diversi anni dopo la vita intrauterina nelle generazioni

successive<sup>9</sup>. Una regolare crescita intrauterina dipende quindi dall'interazione tra fattori genetici costituzionali e dall'ambiente materno. Studi animali sembrerebbero dimostrare una deflessione della curva di crescita nel caso di una restrizione di fattori nutritivi<sup>10,11</sup>, al quale il feto risponderebbe mediante una serie di adattamenti, come ad esempio una riduzione dei depositi adiposi fetali, una modificazione del suo metabolismo glucidico, aumentando l'apporto ematico ad organi nobili quali l'encefalo, il cuore, le ghiandole surrenali, a scapito di altri<sup>12</sup>.

Diversi modelli animali hanno supportato questa ipotesi mediante modelli di restrizione alimentare, basati su una riduzione dell'introito calorico globale, dell'apporto di acidi grassi e della quantità di proteine totali, della legatura delle arterie uterine in grado di determinare un'insufficienza placentare e susseguente ipossia<sup>13</sup>.

L'epoca gestazionale in cui si verificano tali eventi avversi ne condizionerebbe l'esito: se nel periodo periconcezionale infatti potrebbero predisporre a coronaropatie e sovrappeso, nella seconda metà della gravidanza insulino- resistenza e ridotta tolleranza glucidica, soprattutto tra il terzo e il quarto mese di gravidanza<sup>14</sup>. Una spiegazione dello sviluppo quindi in età adulta di CVD, in particolare di ipertensione, e diabete potrebbe essere la conseguenza di una riduzione del numero totale di cellule in alcuni organi, ad esempio a livello renale, o una riduzione del numero di glomeruli. L'iperfiltrazione renale conseguente a quest'ultimo meccanismo contribuirebbe allo sviluppo di una glomerulosclerosi che, abbinata a una riduzione del numero totale dei glomeruli che fisiologicamente si verifica nel corso del tempo, porterebbe ad un'accelerazione del processo di



degenerazione renale, all'avvio di un ciclo perpetuo di rialzo della pressione arteriosa media ed ad un'ulteriore perdita di glomeruli (*Ipotesi di Brenner*)<sup>15</sup>.

### ***Ipotesi di danno endoteliale***

Recenti studi hanno contribuito a comprendere i processi molecolari che posso spiegare gli effetti a lungo termine di precoci influenze dell'ambiente intrauterino sulla funzionalità e sul metabolismo cellulare: modificazioni epigenetiche (es. metilazione del DNA), stress ossidativo (disfunzione mitocondriale, generazione di radicali liberi) e modificazioni di pathways nutritivi (e.g. FOXO, TOR, RAS/AC/PKA), spesso mediati da recettori nucleari<sup>16</sup>.

L'endotelio normalmente secerne un serie di mediatori necessari per il suo corretto funzionamento, incluso il tono vascolare, la coagulazione, la risposta immunitaria ed il controllo della crescita cellulare vascolare. I mediatori vasodilatatori più noti, conosciuti generalmente come Endothelium Derived Relaxina Factors (EDRF), includono l'ossido nitrico (NO), la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e fattori di iperpolarizzazione endotelio-derivati (EDHF)<sup>17</sup>. Tra essi l'Endothelial-derived Nitric Oxide (EDNO) è riconosciuto avere un ruolo chiave nell'ambito della funzionalità vascolare e una sua ridotta disponibilità sembra rivestire un ruolo chiave nell'ambito delle patologie vascolari maggiori<sup>18-19</sup>. Lo stress di parete rappresenta un potente stimolo alla sintesi di ossido nitrico. Una ridotta disponibilità del suo cofattore<sup>20</sup> od un aumento di fattori inibitori endogeni, come la dimetilarginina asimmetrica (ADMA)<sup>21</sup> possono spiegarne una sua riduzione e quindi un aumento del rischio vascolare<sup>22</sup>.

Modelli animali, quindi, hanno mostrato che una basso peso renderebbe la prole più vulnerabile a condizioni di sviluppo avverse nel corso della vita adulta, mostrando un' alterata risposta allo stress, incluso un aumento della concentrazione del cortisolo circolante, soprattutto in condizioni di vita avverse<sup>23-24</sup>. In questo contesto la teoria del “*catch up growth*”, ossia una rapida crescita nel corso dell'infanzia seguita a una ridotta crescita intrauterina, sembra altrettanto responsabile di future malattie cardiovascolari e metaboliche in età adulta. Una disproporzione tra massa magra e grassa nel corso dello sviluppo, e quindi una successiva insulino-resistenza sembrerebbero gettare le basi di tali eventi avversi in età adulta<sup>25</sup>. Sebbene numerosi studi epidemiologici condotti in diverse popolazioni supportino queste considerazioni, il basso peso non sembra costituire un requisito unico, ma sembrerebbero essere possibile bersaglio anche feti large for gestational age (LGA) e feti di peso appropriato ma sottoposti a condizioni stressanti, quali la prematurità.

L'attuale Letteratura sottolinea l'importanza di questi studi in termini di prevenzione, possibili terapie mediche ed innovative strategie alternative nutrizionali/ambientali in grado di prevenire i maggiori eventi cardiovascolari e massimizzare il benessere della popolazione. L'Organizzazione Mondiale della Sanità stima che più di 30 milioni di neonati nascono di basso peso, mentre negli USA l'obesità ha più che duplicato la percentuale di bambini ed adolescenti obesi, passando dal 5 al 17.6% nell'arco di un decennio<sup>26,27</sup>.

### ***Ritardo di crescita intrauterino (IUGR)***

Risale al 1973 l'utilizzo delle curve di crescita fetale in rapporto alla settimana gestazionale per la valutazione della crescita intrauterina e la determinazione di un cut off di sorveglianza (solitamente 10° e 90° centile), anche se tuttavia ancora oggi la prevalenza del ritardo di crescita intrauterino dipende dalla definizione utilizzata (uso del percentile del peso fetale stimato, della circonferenza addominale fetale e della velocimetria Doppler dell'arteria ombelicale).

Con il termine IUGR definiamo un feto che non ha raggiunto il suo potenziale di crescita geneticamente determinato a causa di un insulto avvenuto in una specifica finestra del suo sviluppo, riconducibile per la maggior parte dei casi a un'insufficienza placentare<sup>28</sup>. Due sono le tipologie di feti “piccoli” che compongono questo gruppo: feti piccoli per epoca gestazionale (small for gestational age, SGA) e veri ritardi di crescita (intrauterine growth restriction, IUGR), quest'ultimi riconducibili nella maggior parte dei casi a un'insufficienza placentare. L'utilizzo di curve di crescita corrette per etnia ha consentito di individuare in modo appropriato i veri ritardi di crescita, tenendo in considerazione le caratteristiche antropometriche materne<sup>29</sup>.

L'American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG), la Royal College of Obstetricians and Gynecologists (RCOG) e la Canadian Society of Obstetricians and Gynecologists definiscono un feto SGA mediante un peso stimato inferiore al 10° centile, associato quest'ultimo a un aumentato rischio di morbidità e mortalità<sup>30,31</sup>. Il vero ritardo di crescita, escluse le patologie malformative e cromosomiche, al contrario si configura come un disordine vascolare i cui effetti e la cui severità possono essere valutati

mediante la tecnica Doppler, che non va considerata un metodo di screening per l'individuazione del ritardo di crescita, ma interviene nel management dello stesso. Il Doppler consente di indagare sia la funzionalità placentare, mediante il campionamento delle arterie uterine materne, sia il versante vascolare fetale mediante l'arteria ombelicale, l'arteria cerebrale media, il dotto venoso, l'arteria cerebrale interna e le vene precordiali. Il deterioramento vascolare fetale segue una sequenza che dall'arteria ombelicale arriva a coinvolgere il distretto venoso; tali modificazioni si accompagnano a una modificazione del management clinico dello IUGR: aumento della frequenza del monitoraggio, l'utilizzo di corticosteroidi per l'induzione della maturità polmonare fetale o l'espletamento del parto. L'epoca gestazionale al momento della diagnosi condiziona l'outcome fetale di pari passo alla progressione Doppler del danno vascolare fetale. Un early-onset, diagnosticato prima della 30<sup>a</sup> settimana si accompagna solitamente ad una rapida progressione del deterioramento vascolare arterioso e venoso fetale con un maggiore rischio di parto pretermine e morbidità alla nascita. Un late-onset al contrario si accompagna meno frequentemente ad importante mortalità, ma risulta di più difficile individuazione e può determinare una certa morbidità intra-peripartum.

Il goal del management fetale è rappresentato quindi dal prevenire la morte in utero ed importanti morbidità fetali. Se nell'early-onset IUGR il prolungamento della gravidanza rappresenta il principale obiettivo, il riconoscimento delle sottili caratteristiche di un progressivo deterioramento fetale quello del term-IUGR. La disfunzione multiorgano che può conseguire a questa patologia condizionerebbe la morbidità fetale a breve e lungo termine<sup>32-34</sup>. Feti con peso fetale stimato inferiore al 3° centile, o quelli con

un peso fetale stimato tra il 3° e il 10° centile associato ad alterazioni Doppler sembrerebbero a maggior rischio di outcome sfavorevoli o ricovero in terapia intensiva neonatale, rispetto a quelli che presentano un peso stimato tra il 10° e il 3° centile e una valutazione Doppler fetale regolare<sup>35</sup>.

### ***Modificazioni epigenetiche e ritardo di crescita intrauterino***

Esiste evidenza che una condizione di malnutrizione secondaria a insufficienza placentare porti a una compromissione vascolare a distanza, indicando un effetto intergenerazionale di un evento avverso intrauterino, causato probabilmente da un diverso imprinting genomico<sup>36</sup>

Il grado di nutrimento materno-fetale sembrerebbe in grado di influenzare il genoma fetale, il suo imprinting e l'espressione genica dello stesso. Le alterazioni epigenetiche più frequenti (es. alterazioni stabili dell'espressione genica attraverso modificazioni covalenti del DNA e degli istoni del core) sono rappresentate dalla metilazione del DNA (solitamente a livello della posizione 5 della citosina del nucleotide CpG), dalle modificazioni istoniche (acetilazione, metilazione, ecc) e dai microRNA (miRNAs)<sup>37</sup>. Nel primo caso specifiche metil-transferasi sono coinvolte nei processi di metilazione del DNA, e il bilancio di specifici amminoacidi e nutrienti può essere determinante per gli effetti a lungo termine, soprattutto vascolari e metabolici, a carico di alcuni organi ed apparati<sup>38</sup>. Molti geni infatti, coinvolti in diversi processi epigenetici, risultano alterati, in particolar modo a livello cardiaco, renale, epatico e polmonare, con un'intensità di espressione che varia a seconda del momento in cui l'organo in questione diventa funzionale. Diversi studi hanno posto in relazione le alterazioni

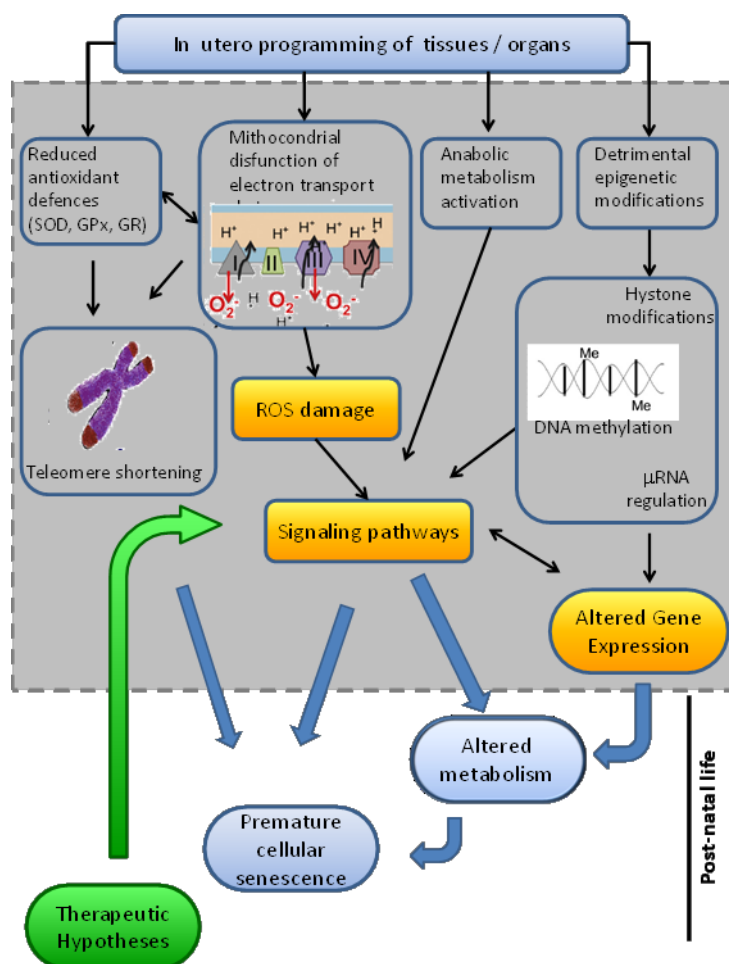
epigenetiche descritte con la crescita, il metabolismo e lo sviluppo cardiovascolare e renale.

### ***Ritardo di crescita, ipertensione arteriosa e danno cardiaco***

Il ritardo di crescita intrauterino sembrerebbe quindi essere un fattore di rischio per patologie endoteliali in età adulta<sup>39,40</sup>. Un aumento dell'espressione del recettore dell'angiotensina II, la produzione di superossido nelle cellule muscolari lisce endoteliali (VSMCs), un incremento della produzione di radicali liberi, una riduzione dell'espressione endoteliale di ossido nitrico sintetasi (eNOS) e un decremento della biodisponibilità di ossido nitrico, tutti potrebbero essere la causa di un'aumentata vasocostrizione e di una ridotta vasodilatazione endotelio-dipendente. La prole di madri sottoposte nel corso della gravidanza a una dieta a basso contenuto proteico presenterebbe ad esempio una soppressione dell'mRNA della renina renale e della sua concentrazione, così come una riduzione della dell'angiotensina II tessutale nel periodo post natale.

Una maggiore sensibilità all'azione del sale sodico introdotto con la dieta, così come un up-regulation dei trasportatori del sodio, sono stati descritti nei modelli di ipertensione placenta-indotta<sup>41,42</sup>. In aggiunta a queste modificazioni funzionali, sembrerebbero inoltre coinvolte alterazioni vascolari di parete, soprattutto a livello aortico, una vasocostrizione periferica, un incremento della rigidità arteriosa e un'alterazione nella composizione della matrice extracellulare dei vasi<sup>43,44</sup>. Recentemente il ruolo versatile dell'endotelio è stato rivalutato nell'ambito delle patologie cardiovascolari. Si tratta di un organo che regola lo scambio di liquidi e di molecole tra il sangue e i tessuti circostanti<sup>45-47</sup>. Presenta una superficie

anticoagulante<sup>48</sup>, contribuisce all'omeostasi vascolare<sup>49</sup> e gioca un ruolo essenziale nella regolazione del tono vascolare<sup>50</sup>.



Una condizione di ipossia cronica agirebbe sulla crescita cellulare, in particolare miocardica ed endoteliale, determinando uno spettro di manifestazioni permanenti<sup>51</sup>. L'incremento del tasso di apoptosi a livello cardiaco susseguente ad ipossia porterebbe ad ipertrofia cardiaca, ad un aumento asimmetrico del suo volume e ad un sovvertimento morfologico delle fibre miocardiche, che renderebbero il cuore stesso nel corso della vita postnatale più vulnerabile a situazioni che richiedono un incremento del carico lavorativo<sup>52</sup>, così come ad una maggiore predisposizione all'infarto<sup>13</sup>.

### ***Ritardo di crescita e modificazioni metaboliche***

Il ritardo di crescita intrauterino risulta in grado di determinare modificazioni neuroendocrine, emodinamiche e metaboliche<sup>13</sup>.

Studi epidemiologici hanno mostrato l'esistenza di un'associazione tra basso peso alla nascita, ridotta tolleranza glucidica e diabete di tipo II. L'etnia, le condizioni socioeconomiche intercorse nell'infanzia e lo stile di vita nel corso dell'età adulta, non sembrerebbero modificare tale relazione<sup>53</sup>. L'esposizione in utero a una dieta a basso contenuto proteico porterebbe nell'animale a una riduzione del numero delle isole e cellule beta pancreatiche, del contenuto di insulina a livello delle stesse ed a una concentrazione inferiore di insulina fetale circolante, come conseguenza di un aumento del processo apoptotico pancreatico<sup>54</sup>. Questo predisporrebbe il feto IUGR a un maggior rischio di insulino-resistenza e diabete di tipo II in età adulta. Il diabete risulta uno dei maggiori fattori di rischio per gli eventi CVD.

### ***Adattamento vascolare e metabolico nell'ambito del ritardo di crescita***

Nel corso del secondo trimestre di gravidanza viene normalmente indirizzato alla placenta un terzo dell'output cardiaco, che negli ultimi mesi diventa un quinto. Feti IUGR con anomalie flussimetriche al contrario indirizzano una quantità di sangue inferiore per mantenere un eguale output cardiaco.

Questo progressivo adattamento può rappresentare uno stadio della patologia che precede il manifestarsi clinico della stessa, mediante una restrizione della crescita ed un incremento dell'impedenza vascolare arteriosa e venosa fetale<sup>55</sup>. Questo potrebbe suggerire che nella fase iniziale di compromissione placentare vengano messi in atto meccanismi più efficaci di estrazione di



ossigeno e nutrienti. Una redistribuzione della circolazione cerebrale, un'accelerazione della maturazione polmonare e una moderata policitemia, tutte comuni nell'ambito della restrizione di crescita, rappresentano inizialmente strategie adattative che diventano patologiche con successivo distress fetale.

L'ipossiemia intrauterina si assocerebbe ad una redistribuzione dell'output cardiaco in favore del ventricolo sinistro, privilegiando l'irrorazione cerebrale, miocardica e di altri organi vitali<sup>56</sup>. Dal momento che il fegato rappresenta la principale sede di produzione proteica fetale, una riduzione del peso corporeo fetale totale potrebbe essere secondaria ad una ridotta vascolarizzazione epatica, che risulta essere normalmente del 30%. Con il progredire della compromissione fetale, una riduzione della vascolarizzazione periferica all'apparato muscolare, renale ed intestinale, possono portare ad esiti irreversibili. L'insulino-resistenza e l'incapacità del muscolo scheletrico di immagazzinare glucosio sembrerebbe incentivare il deposito di glucosio a livello epatico mediante lipogenesi de novo, con conseguente dislipidemia aterogenica.

Tale processo influenzerebbe quindi l'ulteriore insulino resistenza già presente, anche se il meccanismo di induzione del fenotipo obeso genico non risulta ancora chiaramente noto<sup>57</sup>.

### ***Le gravidanze gemellari***

Le gravidanze multiple attualmente risultano più frequenti a seguito dell'incremento al ricorso a tecniche di fecondazione assistita. Se la frequenza delle gravidanze monooriali rimane pressoché stabile con un'incidenza del 3-5/1000 gravidanze, le gravidanze bicoriali presentano un'incidenza varia, dipendente da numerosi fattori quali la razza, le tecniche di riproduzione assistita e l'aumento dell'età materna<sup>58</sup>. Se confrontata con quella dei feti singoli, la curva di crescita dei gemelli si caratterizza per una maggiore incidenza di IUGR in uno dei gemelli, con una percentuale che varia dal 15 al 25% nelle gravidanze monooriali, frequentemente associate ad alterazioni flussimetriche Doppler<sup>59</sup>.

La determinazione della corionicità nel primo trimestre risulta fondamentale in quanto condiziona il rischio ostetrico e il management delle gravidanze gemellari stesse, essendo riconosciuto un maggior rischio di mortalità e sequele neurologiche nelle gravidanze monooriali rispetto alle bicoriali<sup>60</sup>.

### ***Ritardo di crescita selettivo (sIUGR) nelle gravidanze gemellari***

Nelle gravidanze gemellari la curva di crescita di ciascun feto si distingue da quella dei feti singoli per la particolarità della situazione uterina che determina una limitazione al raggiungimento della loro massima capacità di sviluppo senza necessariamente determinare l'instaurarsi di una condizione patologica<sup>61</sup>. Nondimeno anomalie genetiche, infezioni virali, cromosomopatie, o più spesso insufficiente sviluppo placentare e patologie materne non infrequentemente condizionano l'instaurarsi di un vero ritardo di crescita.

Il ritardo di crescita selettivo (sIUGR) di uno dei due gemelli complica circa il 12 % delle gravidanze gemellari con una distribuzione simile tra bicoriali e monocoriali. Unitamente ai disordini ipertensivi materni, presenta una frequenza del 15-30 % superiore rispetto alle gravidanze singole. Si definisce come un peso fetale stimato inferiore al 10<sup>th</sup> percentile (EFW) per epoca gestazionale, associato nella maggior parte dei casi ad alterazioni flussimetriche a carico dell'arteria ombelicale, mentre l'altro gemello presenta una regolare curva di crescita. Dati più recenti hanno incluso nella definizione la discrepanza di peso tra i due gemelli >25%, calcolato come  $[(\text{peso gemello maggiore} - \text{peso gemello minore}) / \text{peso gemello maggiore}] \times 100$ , in quanto si associa a una maggiore percentuale di morbidità e mortalità fetale.

La differenza di crescita risulta potenzialmente più severa nell'ambito delle gravidanze monocoriali, anche se tuttavia il 50-60% dei gemelli piccoli con differenza di peso >25% vengono classificati come small for gestational age (SGA) alla nascita, ossia feti caratterizzati da una minore morbidità e mortalità<sup>59</sup>.

Il motivo che porta a una tale differenza di peso è varia. Circa il 4% può essere attribuita alla discordanza di sesso; la posizione del feto influenza la crescita fetale, dove il gemello trasverso superiore sembra essere più piccolo nel 62 % dei casi. Come per le gravidanze singole, le cromosopatie, le alterazioni genetiche e quelle strutturali possono essere causa di ritardo di crescita, sia in gravidanze monocoriali che bicoriali,.

Una ridotta placentazione ed un'inserzione eccentrica del funicolo contribuiscono alla differenza di peso, soprattutto nelle gravidanze bicoriali.

La Twin to Twin Transfusion Syndrome (TTTS) si verifica all'incirca nel 10-15% delle gravidanze moncoriali e spesso risulta associata a differenza di crescita. L'eziologia di questa patologia è stata largamente definita individuando nelle anastomosi vascolari feto-fetali a livello placentare la causa scatenante, soprattutto le anastomosi artero-venose e le anastomosi artero-arteriose. L'evoluzione e le conseguenze della TTTS sembrano dipendere dal numero delle anastomosi e in particolare dalla presenza o assenza di anastomosi artero-arteriose<sup>62</sup>.

L'importante ruolo di fattori non genetici coinvolti nell'eziologia delle malattie cardiovascolari e renali studiati nei gemelli sostiene l'ipotesi che una programmazione pre e post natale svolga un ruolo chiave nello sviluppo dei componenti della sindrome metabolica in epoca adulta<sup>63</sup>. La gravidanza gemellare rappresenta un modello unico naturale di ritardo di crescita che permette di studiare la differente espressione di una patologia nell'ambito dello stesso ambiente intrauterino<sup>64</sup>.

### ***Diagnosi di sIUGR***

Diversi sono i parametri biometrici che vengono considerati per meglio darne una loro corretta definizione: un peso fetale ecostimato inferiore al 10° percentile per una data epoca gestazionale o una circonferenza addominale inferiore al 5° percentile, entrambi associati ad un indice di pulsatilità Doppler dell'arteria ombelicale due deviazioni standard oltre il valore di normalità. Altri distretti vascolari fetali valutati mediante Doppler sono l'aorta discendente, l'arteria cerebrale media (MCA), il distretto venoso sottodiaframmatico (DV) e la vena ombelicale (UV)<sup>59</sup>.

L'indice di pulsatilità dell'arteria ombelicale risulta però il parametro tutt'oggi determinante nella distinzione tra feti SGA e IUGR; una sua alterazione costituisce un buon indicatore di rischio perinatale e sviluppo psicomotorio avverso. Nelle gravidanze gemellari, come in quelle singole, la velocimetria Doppler risulta parte attiva della valutazione prognostica, influenzando il timing e la modalità del parto grazie alla sua capacità predittiva di una condizione di ipossia-acidemia-asfissia fetale sino allo scompenso emodinamico fetale<sup>32</sup>.

### ***Outcome neonatale***

Studi recenti hanno evidenziato l'associazione esistente tra sIUGR ed aumentato rischio di morte intrauterina per uno o per entrambi i gemelli. L'incidenza di morte endouterina risulta aumentata nelle gravidanze monooriali rispetto a quelle bicoriali.

Benché l'incidenza di ritardo di crescita selettivo non sia differente tra gravidanze monooriali e bicoriali, le prime si associano a una più alta incidenza di morbidità perinatale e neonatale, quali distress respiratorio e danni neurologici. La morbidità conseguente al ritardo di crescita si manifesta sia a breve che a lungo termine<sup>59</sup>.

Sequela a breve termine sono rappresentate da asfissia perinatale, sindrome da distress respiratorio, malattia delle membrane ialine, displasia broncopulmonare, iperbilirubinemia, enterocolite necrotizzante, sino ad emorragia intraventricolare. Tra le sequela minori si riconoscono severa ipotermia, ipoglicemia e sequela metaboliche. Le sequela a lungo termine invece sono rappresentate da difficoltà di apprendimento, problemi

comportamentali in età scolare, insulino resistenza, ipertensione, stroke e ipercolesterolemia nell'età adulta<sup>59</sup>.

### ***Valutazione della funzione vascolare***

Risulta ormai noto che il processo aterogenico inizia precocemente nel corso della vita. Le autopsie condotte su bambini ed adolescenti (dai 2 ai 15 anni di età) che morirono in circostanze non legate a malattie cardiovascolari mostravano la presenza di strie lipidiche e placche fibrose a livello aortico, suggerendo che il danno di parete sembra iniziare nel corso dell'infanzia<sup>65</sup>. Recentemente, il miglioramento delle tecniche di imaging ha consentito di studiare in modo approfondito la struttura, lo spessore e la funzionalità di diversi vasi.

E' noto come nella popolazione adulta generale, così come in persone a rischio, l'aumento dello spessore intima media carotideo, la rigidità di parete e la ridotta funzione vascolare siano indicatori clinici di aterosclerosi; recentemente lo spessore intima medio carotideo (cIMT) ed aortico (aIMT) sono stati utilizzati come indicatori di danno subclinico in bambini IUGR ed obesi<sup>66</sup>.

### ***Studi prospettici in feti, neonato, bambini ed adolescenti con ritardo di crescita intrauterino***

A seguito degli studi condotti da Barker un crescente numero di indagini epidemiologiche sottolinearono il link descritto tra basso peso alla nascita, rapido incremento ponderale nei primi anni di vita, obesità nel corso dell'adolescenza ed un aumentato rischio di CVD, stroke, intolleranza glucidica e diabete tipo II nel corso della vita adulta. Una ridotta statura,

inoltre, seguita da un successivo rapido incremento, è stato collegato ad un aumento del rischio di malattia coronarica<sup>67-69</sup>, che si riduce del 20% per ogni incremento di un kilogrammo del peso alla nascita, che corrisponde ad una riduzione della pressione diastolica di 5 mmHg, di 1.9 mmHg della pressione sistolica e di 40 mg/dl nella concentrazione delle lipoproteine a bassa densità (LDL)<sup>70</sup>.

Nei feti IUGR un incremento del tono simpatico e una condizione dislipidemica (un aumento della concentrazione delle apolipoproteine B, delle apolipoproteine A1, una riduzione nella concentrazione dell' insulin-like growth factor 1) potrebbero contribuire al danno endoteliale già esistente<sup>71,72</sup>. Diversi studi post mortem confermarono questa ipotesi, evidenziando una correlazione inversa tra peso alla nascita e severità delle lesioni aortiche<sup>65</sup>.

Studi osservazionali suggerirono a tal proposito il ruolo aggiuntivo svolto da cellule endoteliali (EC), cellule del sistema immune, cellule muscolari lisce (SMC), leucociti, glucosaminoglicani interstiziali (GAG) e depositi di calcio nell'incrementare lo spessore intima medio aortico<sup>73,74</sup>.

L'indagine immunoistochimica della parete aortica di un feto IUGR deceduto in utero confermava l'ispessimento aortico evidenziato nel corso della gravidanza mediante indagine ultrasonografica. Un indagine ad immunofluorescenza metteva in evidenza, a dispetto che nei feti di peso appropriato per epoca gestazionale, una condensazione delle fibre elastiche, diffuse, sottili, e non organizzate, a livello della membrana elastica interna (IEM), che risultava frammentata e parzialmente duplicata.

Altri elementi caratterizzanti la parete aortica IUGR erano il CD68, un diffuso marker macrofagico, normalmente assente nella parete vascolare; la

selectina E, un marker di EC attivate, ed infine il CD31, un marker di EC quiescenti, possibili markers di lesioni aterosclerotiche<sup>75</sup>. Tale risultato venne poi confermato dalla scoperta di un aumento della concentrazione di IL23 nel liquido amniotico di feti IUGR, suggerendo un ruolo nell'infiammazione aortica. L'IL23 stimola i linfociti T CD4+ naive a differenziarsi in cellule Th17, coinvolte nella patogenesi di diverse malattie infiammatorie croniche e malattie autoimmuni<sup>76</sup>.

Skilton et al. descrisse per primo la misurazione ecografica dello spessore intima media aortico (aIMT) nei bambini di basso peso alla nascita come un marker accurato e sensibile di rischio aterosclerotico<sup>71,77,78</sup>. Il nostro gruppo confermò in feti e neonati con ritardo di crescita ed alterazioni Doppler una sua relazione inversa con il peso fetale stimato, valutando il ruolo della aIMT come possibile marker di danno endoteliale subclinico<sup>79,80</sup>.

Contrariamente ad altri gruppi, abbiamo quindi classificato i bambini IUGR tenendo in considerazione la valutazione ecografica flussimetrica fetale e materna. Un incremento dell'indice di pulsatilità aortica infatti potrebbe essere indicativa di un incremento della rigidità di parete che presenta caratteristiche simili a quelle descritte nell'ipertensione arteriosa. Tali risultati sono stati confermati nell'ambito delle gravidanze gemellari, che rappresentano come già descritto un modello unico di ritardo di crescita intrauterino. Lo spessore aIMT risultava maggiore nei gemelli IUGR ed alterazioni Doppler, indipendentemente dal sesso e dalla corionicità, confermando il dato trovato nei feti singoli. Il gruppo di gemelli IUGR senza alterazioni flussimetriche sembrano costituire un gruppo di feti il cui rischio non è tutt'oggi ancora ben compreso o sottostimato. In questo gruppo infatti



lo spessore alMT risultava inferiore rispetto a quella del gruppo patologico, ma maggiore di quello dei gemelli di peso appropriato per epoca gestazionale, suggerendo l'esistenza di un possibile grading di danno endoteliale. Il basso peso alla nascita e le anomalie velocimetriche Doppler potrebbero quindi costituire i maggiori predittori di disfunzione vascolare<sup>81</sup>.

Non è noto se questi elementi potrebbero avere altrettanta valenza nell'ambito delle gravidanze gemellari, ed attualmente costituisce oggetto di dibattito se questa associazione rifletta comuni vie genetiche o sia secondaria ad una programmazione dovuta a influenze avverse intrauterine.

Utilizzando un approccio metabolomico, abbiamo recentemente evidenziato la presenza di significative differenze tra feti singoli IUGR ed AGA nella distribuzione di alcuni amminoacidi essenziali<sup>86,87</sup>, in particolar modo dei livelli sierici di fenilalanina, sfingosina e glicerofosfolina. La sfingosina 1-fosfato, prodotta a partire dalla sfingomielina, risulta espressa anche a livello del sistema cardiovascolare, e può essere coinvolta nella patogenesi di alcune malattie associate alla disfunzione endoteliale<sup>88,83</sup>. A causa delle loro proprietà vasoattive, gli sfingolipidi potrebbero giocare un ruolo precursore nell'ambito dell'ipertensione arteriosa esemplificata dal fatto che la modulazione farmacologica della composizione vascolare sfingolipidica in modelli animali indurrebbe una risposta contrattile transitoria in diversi vasi. In particolare, un incremento del ceramide, precursore della sfingosina, potrebbe indurre un certo rilascio endotelio-dipendente di trombassano A2, coinvolto nell'ipertensione, e l'esocitosi di sostanze pro-infiammatorie, pro-coagulatorie e vasoattive<sup>84,85</sup>.

Queste modificazioni che avvengono in utero potrebbero quindi avere un ruolo nell'irrigidimento prematuro in utero della vascolatura arteriosa,

predisponendo questi individui ad ipertensione, nefropatie, ed a sindrome metabolica in età adulta<sup>86</sup>.

### ***Modificazioni renali nel feto IUGR***

L'apparato renale in via di sviluppo potrebbe essere estremamente suscettibile alla ridistribuzione vascolare secondaria al ritardo di crescita, e spesso i reni si presentano di volume ridotto in proporzione alle dimensioni corporee. Diversi studi animali ed umani hanno inoltre descritto un ridotto numero di nefroni<sup>87,88</sup>. Un decremento dell'area di superficie di filtrazione glomerulare si accompagnerebbe da un incremento del flusso renale glomerulare per mantenere un tasso di filtrazione glomerulare costante.

In accordo con l'ipotesi dell'iperfiltrazione proposta da Brenner questo condurrebbe ad un'ipertensione ed ipertrofia glomerulare, con successiva ipertensione sistemica, maggiore riassorbimento di sodio, glomerulosclerosi ed albuminuria<sup>89</sup>.

Diversi studi condotti in bambini, adolescenti e giovani adulti IUGR a rischio di CVD e malattie renali hanno sottolineato l'associazione tra IUGR e danno glomerulare, anche se i meccanismi che ne stanno alla base non sono ancora non completamente noti<sup>71,78,90</sup>.

La via che condurrebbe ad un ridotto volume renale sino all'ipertensione arteriosa sembrerebbe includere il sistema renina- angiotensina-aldosterone, compromesso nella prima fase della patologia in risposta ad un ridotto numero di nefroni<sup>91</sup>. Questi meccanismi sono stati ben descritti in studi sperimentali condotti in animali IUGR<sup>92</sup> e negli ultimi 5 anni gli studi clinici in tal senso si sono moltiplicati. Keijzer-Veen nel 2005 identificò un'associazione positiva tra peso alla nascita e tasso di filtrazione

glomerulare (GFR), così come una correlazione negativa tra lo stesso e i livelli sierici di creatinina<sup>93</sup>. Una meta analisi pubblicata da Teeninga et al. nel 2008 ha considerato 201 pazienti (25 SGA, 176 AGA); egli mise in evidenza come il basso peso alla nascita presentasse una forte associazione con la presenza di proteinuria, con elevata probabilità di sviluppare severe complicanze successive, quali l'ipertensione<sup>94</sup>. In un recente follow up il nostro gruppo ha descritto un aumento dell'albuminuria e della sodiuria in feti e bambini singoli IUGR, mentre l'escrezione di aldosterone e lisozima risultava invariata<sup>95</sup>. D'accordo con Menzel e Moeller possiamo considerare sia la microalbuminuria che la sodiuria una conseguenza del danno a carico degli stessi podociti glomerulari<sup>96</sup>. Le cellule endoteliali e i podociti infatti presentano la stessa origine embrionale, e questa considerazione supporta l'ipotesi che un danno intrinseco renale verificatosi in utero, associato a un danno estrinseco vascolare, potrebbero contribuire alla compromissione renale e cardiovascolare che si manifesterebbe quindi in età adulta.

### ***Markers di danno renale***

NGAL (Neutrophil Gelatinose-Associated Lipocalin) è una glicoproteina della famiglia delle lipocaline, espressa da neutrofili e diverse cellule epiteliali, la cui produzione avviene fin dalla 12ª settimana gestazionale.

Tale glicoproteina presenta molteplici funzioni, immunitarie e di trasporto di diverse sostanze (prostaglandine, retinoidi, acido arachidonico, acidi grassi, steroidi, ferro e metalloproteinasi).

La concentrazione sierica di NGAL è aumentata in casi di infiammazione, infezione, patologie cardiache, renali e nei casi di resistenza insulinica<sup>97-99</sup>.

Recente interesse è stato dimostrato nella valutazione della concentrazione sierica ed urinaria di NGAL come marcatore diagnostico precoce di danno renale acuto, sia nella popolazione pediatrica che adulta.

Per danno renale acuto si intende un danno renale di qualsiasi origine, definito da un improvviso rialzo della creatinina sierica di almeno 0.3 mg/dL in 48 ore (stage 1 of the Acute Kidney Injury Network's definition). Si associa ad un' alta mortalità tra i pazienti pediatrici ed adulti sottoposti a terapie intensive. Il tasso di mortalità causato da AKI non si è modificato negli ultimi 50 anni a causa della mancanza di biomarkers precoci di insufficienza renale e ad un successivo ritardo delle terapie<sup>100</sup>.

Una meta-analisi di 19 studi, che includeva 2500 pazienti (comprendente adulti e popolazione pediatrica) ha rilevato che NGAL costituisce un marker urinario e plasmatico di AKI (danno renale acuto) più precoce rispetto al rialzo della creatinina sierica e dell'azotemia plasmatica<sup>101</sup>.

.

### ***Valutazione di NGAL in epoca neonatale***

Sono numerosi gli studi riguardanti l'associazione tra le concentrazioni sieriche ed urinarie di biomarker renali tra cui NGAL in neonati pretermine e lo sviluppo di insufficienza renale in tale popolazione.

La prematurità rappresenta un fattore di rischio per lo sviluppo di tale complicanza assieme ad un incompleto sviluppo renale ( la formazione dei glomeruli e dei tubuli renali continua oltre la 34ª settimana gestazionale)<sup>96</sup>, ad una maggior esposizione a terapie nefrotossiche ed alla possibile coesistenza di altre comorbidità tra cui la pervietà del dotto arterioso e la sindrome da distress respiratorio. Nei neonati pretermine la diagnosi precoce di danno

renale acuto basato sulla concentrazione sierica di creatinina si è rilevata problematica; non solo la creatininemia non si modifica se non in presenza di un danno renale pari al 25-50%, ma viene anche influenzata dalla massa muscolare, dallo stato di idratazione e dal sesso. Nei primi giorni di vita, inoltre, la creatininemia neonatale riflette in parte la creatininemia materna, poichè quest' ultima oltrepassa la placenta<sup>102-104</sup>.

NGAL si configura come un possibile marker precoce di danno renale poichè la quota rilevabile a livello urinario deriva dalla produzione dell'epitelio del tubulo renale e non dalla filtrazione di tale glicoproteina. Inoltre, in modelli animali, la secrezione renale di tale glicoproteina da parte dell'ansa di Henle e dei dotti collettori aumenta in caso di ischemia acuta ed a seguito dell'utilizzo di sostanze nefrotossiche<sup>105-109</sup>.

Diversi studi hanno rilevato che neonati pretermine presentano una maggiore concentrazione di NGAL urinario rispetto a nati a termine di gravidanza, in modo inversamente proporzionale al peso corporeo alla nascita ed all'età gestazionale<sup>96,110-111</sup>. Da questi dati emerge anche la ricerca di un nomogramma per le concentrazioni di NGAL urinario nel prematuro. Lo studio prospettico di Huynh et al.<sup>110</sup>, basato su 50 neonati di età gestazionale alla nascita > 26 settimane e peso > 750 g, stabilisce un reference range di NGAL urinario comparabile a quello riportato per la popolazione pediatrica ed adulta, anche se non esiste un consenso unanime sul cut-off relativo a questa popolazione.

Numerosi sono i dati riguardanti la possibile correlazione tra concentrazione di NGAL urinario neonatale ed il rischio di disfunzione renale<sup>111-113</sup>. Uno studio prospettico di 40 neonati pretermine con un peso alla nascita  $\leq$  1500g (composti dal 20% di SGA ed esclusi i casi di anomalie congenite e sepsi

neonatali) mostrava una correlazione significativa tra la concentrazione urinaria di NGAL e del rapporto tra la concentrazione urinaria di NGAL e creatininuria alla nascita e successivo sviluppo di danno renale<sup>114</sup>. Tali autori ipotizzavano che l'aumento di NGAL nelle urine dei neonati pretermine con alterazione della funzionalità renale fosse dovuto ad un danno ischemico prerenale che comprometteva il completamento della nefrogenesi nelle prime settimane di vita, o ad una produzione di NGAL da parte dell'epitelio renale, come stimolo alla glomerulogenesi. Gli stessi autori non escludevano inoltre una possibile influenza di altri fattori ambientali, genetici, materni, infiammatori coinvolti nella concentrazione urinaria neonatale di tale peptide.

Ciononostante, non è ancora stato stabilito un nomogramma universalmente accettato e non vi sono dati unanimi circa l'accuratezza diagnostica di tale glicoproteina, soprattutto nell'ambito del ritardo di crescita. Tale causa potrebbe essere attribuita all'eterogeneità della popolazione presa in esame e dalla scarsa numerosità degli studi eseguiti.

### ***Valutazione di NGAL fetale***

La letteratura descrive una produzione di NGAL fetale a partire dalla 12ª settimana di gravidanza, a livello del parenchima polmonare, dell'epitelio del piccolo intestino, dei condrociti e dell'epidermide<sup>115</sup>.

Una recente pubblicazione<sup>116</sup> ha preso in considerazione la produzione di NGAL da parte della decidua e del trofoblasto. Solo questo ultimo, ed in particolare il citotrofoblasto, esprimerebbe il gene NGAL, sia in condizioni basali che aumentati, a seguito di stimoli proinfiammatori, tra cui IL-1 $\beta$  e

TNF- $\alpha$ . Da tale studio si evinceva un possibile aumento di NGAL in caso di infezioni intra-amniotiche, come possibile marker di corioamniosite.

### ***Microalbuminuria***

Con microalbuminuria si intende un' anormale escrezione urinaria di albumina compresa tra 20-200 mg/min o 30-300 mg/die. Il rene svolge un importante ruolo nella regolazione della pressione arteriosa. Studi prospettici ed epidemiologici hanno permesso di attribuire alla microalbuminuria il ruolo di fattore predittivo di precoce danno endoteliale, nonché di sensibile indicatore di disfunzioni metaboliche e di modificazioni emodinamiche. Il meccanismo fisiopatologico che sottolinea l'associazione tra escrezione di albuminuria e danno cardiovascolare non è stato ancora ben definito; un'ipotesi è che rifletta un danno endoteliale subclinico renale e a carico del restante letto vascolare, tale da predisporre a futuri eventi cardiovascolari<sup>117</sup> e che potrebbe spiegare l'alterata filtrazione glomerulare che intercorrerebbe nel gruppo dei bambini IUGR<sup>95</sup>, correlandosi inoltre positivamente alla pressione arteriosa sistolica. La diagnosi precoce di anomalie della funzionalità renale si basa sulla valutazione della creatininemia sierica, del filtrato glomerulare e dell'escrezione urinaria di albumina (microalbuminuria definita come rapporto albumina/creatinina (ACR). Le alterazioni di questi parametri possono essere presenti in concomitanza o isolatamente, ed è dibattuto se e quale sia la metodologia ottimale per l'individuazione precoce dei soggetti a rischio cardio-renale.

Strategie di screening di massa per l'individuazione di queste anomalie potrebbero rappresentare un efficace strumento di prevenzione del rischio

cardio-renale poiché i soggetti a rischio sarebbero prontamente trattati con farmaci che agiscono sul sistema renina-angiotensina rallentando la progressione del danno renale e riducendo il rischio cardio-vascolare.

Diventa chiaro quindi come esista un periodo nel corso del quale l'uso di termini quale programmazione, plasticità e risposta adattativa debbano acquisire un ruolo sempre più importante non solo nell'ambito dell'iponutrizione ma anche dell'ipernutrizione.

Crescenti evidenze quindi sottolineano un'associazione inversa tra peso alla nascita e pressione arteriosa in bambini, adolescenti e adulti. Questo consentirebbe di fornire nuove prospettive patogenetiche e strategie di prevenzione<sup>118</sup>, anche se i meccanismi biologici che ne stanno alla base non sono ancora chiaramente noti. Abbiamo esaminato il ruolo che possono assumere il ritardo di crescita, l'ispessimento aortico ed un aumento della pressione arteriosa nel corso dell'infanzia. La misurazione dello spessore aIMT ha facilitato l'identificazione di finestre di crescita critiche che possono influenzare la risposta vascolare e sistemica fetale<sup>119</sup>. Studi condotti in bambini IUGR hanno inoltre dimostrato come questa non sia una prerogativa delle sole forme precoci e severe di IUGR, ma che possano avvenire anche in quelle forme considerate mild and late-onset. In entrambi i gruppi si sono osservati inoltre un aumento del volume cardiaco, un suo ridotto movimento longitudinale e una compromissione della sua distensibilità<sup>120</sup>.

Tali considerazioni suggeriscono che, in aggiunta ai meccanismi patogenetici proposti, un aumento dello spessore di parete, della pressione arteriosa e le modificazioni cardiache susseguenti siano probabilmente già presenti in feti



IUGR nel corso della vita intrauterina; e questo, insieme ad altri fattori quali il fumo, dieta ricca di grassi e l'inattività, sembrerebbe giocare un ruolo nella programmazione delle malattie dell'adulto.

Nonostante le attuali linee guida pediatriche ancora non includano il ritardo di crescita tra i fattori di rischio per CVD, si raccomanda comunque di sottoporre questi bambini a verifiche della pressione arteriosa con l'intento di impiegare strategie di prevenzione, come ad esempio modificazioni dello stile di vita.

### ***Scopo dello studio***

Valutare lo spessore intima media aortico (aIMT) in feti gemelli con ritardo di crescita intrauterino con e senza alterazioni velocimetriche Doppler, in comparazione ai feti gemelli di peso appropriato per epoca gestazionale, e la relazione esistente tra spessore aortico (un marker di aterosclerosi preclinica) e la concentrazione di albumina ed NGAL nel liquido amniotico di ciascun gemello.

## MATERIALI E METODI

Le pazienti sono stati reclutate presso la Clinica Ostetrica del Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino dell'Università di Padova tra Gennaio 2009 e Giugno 2013 al momento dell'ecografia del primo trimestre o nel corso del terzo trimestre nel caso in cui la paziente sia giunta tardivamente alla nostra osservazione. Lo studio è stato approvato dal comitato etico dell'Azienda Ospedaliera di Padova. Alcune pazienti erano infine parte di uno studio in itinere condotto sulle gravidanze gemellari<sup>79</sup>. I dati riguardanti le pazienti e la loro gravidanza sono stati raccolti in un database comune, come da normale pratica clinica. I criteri di inclusione dello studio prevedevano gravidanze multiple ed una corretta datazione della gravidanza basata sull'ultima mestruazione eco-confermata prima della 20<sup>a</sup> settimana di gravidanza. La corionicità è stata definita mono o bicoriale in base alla presenza ecografica del "T o lambda sign", a 10-14 settimane di gravidanza. Criteri di esclusione erano le gravidanze tricoriali, le monocoriali monoamniotiche, le malformazioni congenite maggiori, le gravidanze complicate da storia materna di ipertensione pre o gestazionale, preeclampsia, disordini endocrini quali il diabete, disfunzioni tiroidee o surrenaliche, corionamnionite clinica, rottura prematura delle membrane, anidramnios, TTTS, così come l'assunzione di alcol, droghe, corticosteroidi o ritodrina (ad esclusione che per la maturazione polmonare fetale).

La definizione del percentile del peso alla nascita per epoca gestazionale ha previsto l'utilizzo di tabelle standard di riferimento per le gravidanze gemellari<sup>29</sup>. L'indice di pulsatilità (PI) dell'arteria ombelicale è stato calcolato seguendo le raccomandazioni presenti in merito al monitoraggio Doppler della gravidanza<sup>32</sup>.

Il ritardo di crescita di uno dei due gemelli è stato definito in base alla presenza o meno di alterazioni flussimetriche a carico dell'arteria ombelicale ( $> 2SD$ ), associate in entrambi i casi a un EFW  $< 10$ th centile (Gruppo A e B, rispettivamente). Feti gemelli AGA (Gruppo C) sono stati definiti da un peso alla nascita compreso tra il 10° e il 90° centile per epoca gestazionale. Come già descritto precedentemente<sup>95</sup> si è valutato lo spessore aIMT di ciascun gemello ad una mediana di 32 settimane (interquartile 30-34 settimane) mediante un ecografo ad alta risoluzione (Antares, Siemens medical Solutions, Mountain View, CA) e una sonda lineare da 3.5-5 MHz. Lo spessore intima media aortico è stato misurato in una sezione sagittale-coronale del feto, in posizione dorsale, a 15 mm sotto le arterie renali e sopra le arterie iliache, nel punto di campionamento dell'aIMT, come precedentemente descritto<sup>79</sup>; le immagini sono state quindi ottimizzate mediante l'utilizzo del gain. L'aIMT addominale è stata definita come la distanza tra la superficie interna della superficie sangue-intima e quella intima-avventizia, nella parte distale del vaso<sup>77</sup>. Il valore riportato è quello medio tra tre misurazioni prese al termine della diastole per minimizzare la variabilità nel corso del ciclo cardiaco.

Il diametro aortico è stato valutato nello stesso punto dello spessore intima-media aortico considerando la distanza esistente tra le superfici interne del vaso. L'aorta è stata visualizzata in una scansione longitudinale del feto con un'inclinazione della sonda il più possibile a 0 gradi e comunque inferiore a 30 gradi.

Tutte le pazienti sono state viste una volta al mese sino alla 28<sup>a</sup> settimana e quindi ogni 15 giorni sino al termine nel caso di gravidanze bicoriali biamniotiche, e due volte al mese da inizio gravidanza in caso di gravidanze monocoriali biamniotiche. La crescita fetale, la valutazione Doppler ed il profilo biofisico fetale sono stati considerati indici di benessere fetale. Nel corso dell'indagine ecografica sono stati inoltre misurati i volumi renali fetali mediante la formula dell'ellissoide. Il timing del parto è stato valutato in base alla crescita fetale, alla valutazione Doppler, all'epoca gestazionale ed alla visita ostetrica.

Tutte le gravidanze gemellari hanno esitato in parto cesareo, previa somministrazione di corticosteroidi in caso prima della 34<sup>a</sup> settimana.

Alla nascita si sono registrati: motivo del ricovero, settimane gestazionali, modalità del parto, sesso, peso e lunghezza alla nascita, circonferenza cranica (CC), outcome neonatale (Apgar al 5° minuto) e l'eventuale accesso in patologia neonatale.

Si è considerato sfavorevole un outcome perinatale caratterizzato da: morte perinatale, malattia delle membrane ialine, emorragia intraventricolare di grado >3, leucomalacia periventricolare, enterocolite necrotizzante, episodi di sepsi e di disfunzione miocardica.

E' stato quindi eseguito un prelievo di liquido amniotico al momento del taglio cesareo, da entrambi i sacchi amniotici, per la determinazione della concentrazione di albumina, creatinina, rapporto ACR ed NGAL. L'albumina amniotica è stato ottenuta utilizzando un metodo immunonefelometrico (BNTM<sup>II</sup>, Siemens Medical Solutions), la creatinina mediante il metodo colorimetrico Jaffè (Roche Diagnostics, Monza, Italy) e l'NGAL mediante l' Architect System (Abbott).

### **ANALISI STATISTICA**

I dati sono stati analizzati considerando significativa una  $p < 0.05$ . La normalità delle variabili è stato testata con il test di Kolmogorov-Smirnov. I dati non parametrici sono stati presentati con il valore mediano e l'intervallo degli interquartile (IQR), mentre i dati parametrici sono stati descritti con il valore medio e la sua deviazione standard. Inoltre i dati categorici sono stati presentati come percentuali. Il test di Kruskal Wallis o la one-way anova sono stati utilizzati per le variabili continue dove opportuno. Per il confronto di multiple variabili categoriche è stato usato il test del chi-quadrato. Infine sono stati applicati i seguenti test statistici dove opportuno: il test di Wilcoxon, o il t di Student per le variabili continue e il test del chi-quadrato o il test esatto di Fisher per le variabili categoriche.

## RISULTATI

197 pazienti gemellari, di cui 153 bicoriali biamniotici e 44 monocoriali biamniotici hanno soddisfatto i criteri di inclusione, nello specifico i 394 gemelli sono stati suddivisi in: 61 feti Gruppo A, 35 feti Gruppo B e 298 feti Gruppo C.

Si sono riscontrati nel gruppo IUGR 5 casi di ipertensione gravidica e uno di preeclampsia; due casi di ritardo di crescita erano inoltre riconducibili ad inserzione marginale del funicolo.

Le caratteristiche cliniche e antropometriche delle pazienti sono riassunte nella tabella I.

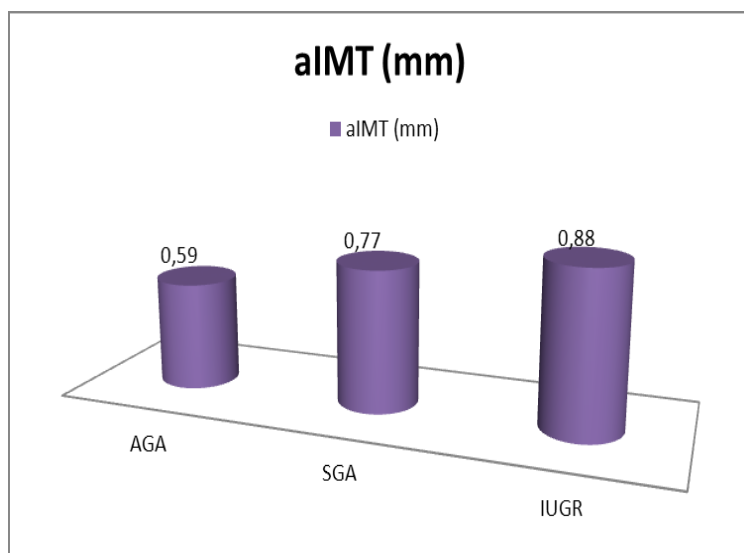
**Tabella I. Caratteristiche antropometriche e cliniche delle pazienti**

		<b>AGA</b>	<b>IUGR</b>	<b>SGA</b>	<b>P-Value</b>
		<b>N= 298</b>	<b>N= 61</b>	<b>N= 35</b>	
<b>Età</b>		33* ( $\pm 4,86$ )	32,4 ( $\pm 4,06$ )	33,3 ( $\pm 5,26$ )	0,73
<b>Nulliparità</b>		62.7%	72%	74%	NS
<b>Etnia</b>	<b>Caucasica</b>	59.6%	10.4%	19,2%	0.05
	<b>Africana</b>	7,7%	0%	1,2%	0.05
	<b>Asiatica</b>	1,2%	0,4%	0,4%	NS

\*Dati espressi come media e deviazione standard

Tutte le pazienti risultavano comparabili circa l'età media al reclutamento, la parità, la corionicità, e le dosi di betametasone somministrati (ciclo unico). Tutte sono state sottoposte a taglio cesareo. Le alterazioni flussimetriche più frequenti nel Gruppo A sono state assenza di flusso in diastole a carico dell'arteria ombelicale, centralizzazione del circolo e deterioramento del dotto venoso, presente quest'ultimo in un terzo dei feti IUGR.

Dal punto di vista ecografico, il valore medio dell' aIMT risultava differente tra i tre gruppi ( Gruppo A 0.88 mm, Gruppo B 0.7 mm e Gruppo C 0.5 mm) ( $p<0,0001$ ). L'aIMT del Gruppo A era maggiore del Gruppo C ( $p<0.0001$ , aggiustata per comparazioni multiple); era maggiore nel Gruppo B rispetto al Gruppo C ( $p=0.003$ , aggiustata per comparazioni multiple), ed era maggiore nel Gruppo A rispetto al Gruppo B ( $p<0.05$ , aggiustata per comparazioni multiple) (Figura 1).



**Figura 1. aIMT parete posteriore aorta addominale (aIMT) fetale valori medi riscontrati nei tre gruppi esaminati.**

Al contrario non si è trovata differenza statisticamente significativa per le altre variabili ecografiche, compresi i volumi renali (Tabella II).

L'emodinamica fetale del Gruppo B non presentava differenza statisticamente significativa rispetto al Gruppo C, come atteso (p 0.59).

**Tabella II. Dati ecografici fetali**

	<b>AGA</b>	<b>SGA</b>	<b>IUGR</b>	<b>P-Value</b>
<b>Numerosità</b>	298	61	35	
<b>SG</b>	34 (±2,63)	32,08 (±2,33)	31,8 (±2,77)	0,88
<b>all'ecografia</b>				
<b>Parete post.</b>	<b>0,59 (±0,16)</b>	<b>0,77 (±0,16)</b>	<b>0,88 (±0,18)</b>	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Aorta</b>				
<b>Diametro</b>	3,96 (±0,93)	3,93 (±0,62)	3,82 (±0,69)	0,69
<b>Aorta</b>				
<b>PI Aorta</b>	1,28 (±0,43)	1,50 (±0,33)	1,45 (±0,02)	0,74
<b>PI arteria</b>	1,01 (±0,21)	0,98 (±0,23)	1,06 (±0,31)	0,59
<b>ombelicale</b>				
<b>Volumi renali</b>	11532 (±7145,9)	9331,5 (±3395,8)	11430 (±4547,3)	0,36

Dati espressi come media e deviazione standard

L'età gestazionale media al parto, il peso alla nascita, la lunghezza, la circonferenza cranica, l'Apgar Score a 5 minuti e l'emogasanalisi alla nascita mostravano differenze statisticamente significative tra i tre gruppi, come riassunte in Tabella III.



**Tabella III. Dati al parto**

	<b>AGA</b>	<b>SGA</b>	<b>IUGR</b>	<b>P-Value</b>
<b>SG al parto</b>	<b>34,5 (±2,3)</b>	<b>35,4 (±1,95)</b>	<b>33,9 (±2,79)</b>	<b>&lt;0,05</b>
<b>Peso alla nascita (g)</b>	<b>2314,3 (±463,4)</b>	<b>2025,3 (±352,34)</b>	<b>1493 (±453,25)</b>	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Lunghezza (cm)</b>	<b>44,68 (±2,98)</b>	<b>43,39 (±3,17)</b>	<b>40,89 (±4,45)</b>	<b>&lt;0,0001</b>
<b>CC (cm)</b>	<b>31,94 (±1,96)</b>	<b>31,52 (±1,81)</b>	<b>30,07 (±2,15)</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>Apgar 5'</b>	<b>9,02 (±0,83)</b>	<b>9,14 (±0,69)</b>	<b>8,59 (±0,76)</b>	<b>&lt;0,01</b>

Dati espressi come media e deviazione standard

Sono stati ricoverati in TIN (terapia intensiva neonatale) 33 neonati AGA (11,1%) soprattutto a causa della prematurità; 6 gemelli SGA (9,8%) e 11 neonati IUGR (31,4%). Per quanto riguarda le complicanze neonatali maggiori, 11 neonati del gruppo AGA, 4 del gruppo degli SGA e 1 neonato del gruppo degli IUGR hanno contratto la malattia delle membrane ialine. L'iperbilirubinemia è stata riscontrata nel 48% dei neonati del gruppo AGA, nel 45% dei neonati del gruppo IUGR e nell'83% dei neonati del gruppo SGA. Non ci sono state complicanze severe come enterocolite necrotizzante, emorragie intraventricolari di grado III o leucomalacia periventricolare.

Altre complicanze meno comuni sono state l'ipoglicemia transitoria (15% negli AGA, 27% negli IUGR, 16% negli SGA), l'anemia (28% negli AGA, 33% negli SGA, 18% negli IUGR) e la sospetta sepsi (17% negli AGA, 33% negli SGA e 9% negli IUGR).

### **Markers urinari**

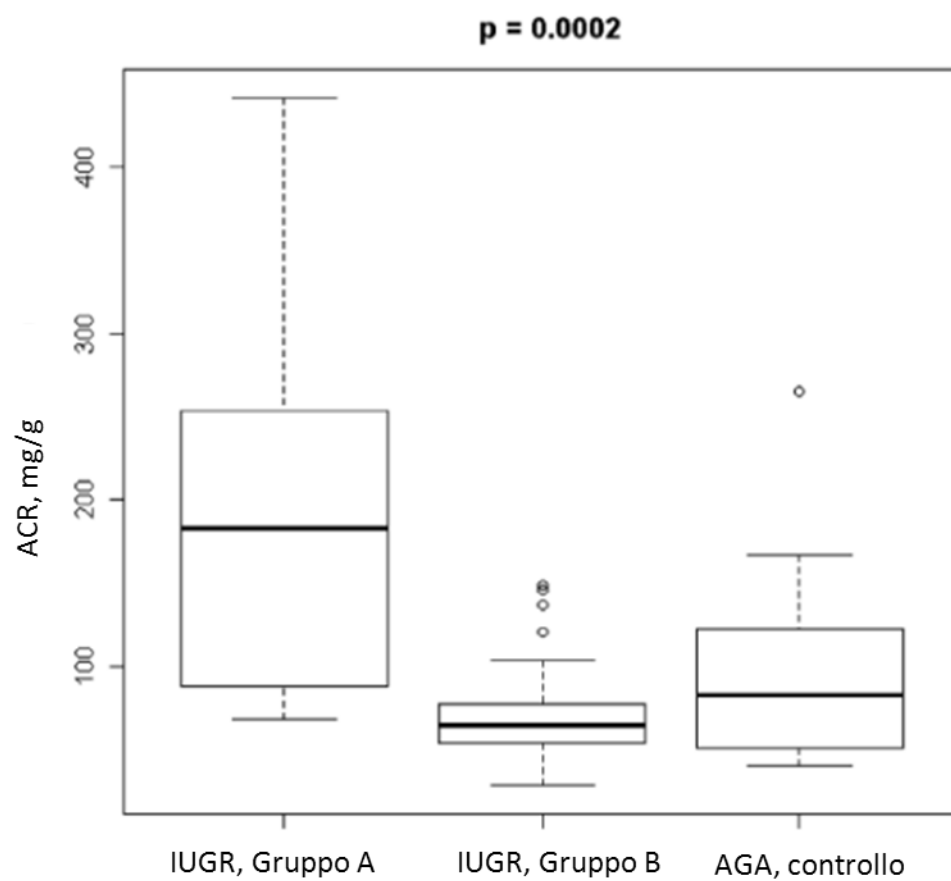
La concentrazione media amniotica di albumina risultava significativamente maggiore nel Gruppo A rispetto al Gruppo B (p 0.02), mentre si presentava simile nel Gruppo B rispetto al Gruppo C (p 0.25). Il rapporto ACR era differente nei tre gruppi (Gruppo A 183,500 mg/g, Gruppo B 64,720 mg/g, Gruppo C 82,750 mg/g; p= .0002) (Figura 2), in particolare maggiore nel Gruppo A rispetto al Gruppo C (p 0.03), simile tra il Gruppo B e C (p 0.39) e maggiore nel gruppo A rispetto al Gruppo B (p 0.02).

La comparazione intra-gemelli mostrava una significativa differenza tra aIMT (0.3 [0.1-0.6] mm, p=.001 e 0.2 [0.1-0.3] mm, p=.0006, rispettivamente) ed ACR (2.777 [1.098-59.364], p= .23, rispettivamente).

**Tabella IV. Concentrazioni amniotiche di creatinina ed albumina tra i gruppi di gemelli**

	Gruppo A	Gruppo B	Gruppo C	p
<b>Creatinuria (mg/L)</b>	0.14(0.06-0.16)	0.13(0.12-0.16)	0.10(0.08-0.12)	.02
<b>Albuminuria (g/L)</b>	1.24(1.04-1.56)	1.07(0.82-1.40)	1.42(1.19-2.33)	.01
<b>ACR (mg/g)</b>	82.750 (51.070-119.200)	64.720 (53.990-76.220)	183.500 (59.370-116.600)	.0002

Note: Gruppo A: gemelli IUGR, Gruppo B: gemelli SGA, Gruppo C: gemelli AGA  
ACR: albuminuria/creatininuria ratio; i dati sono stati espressi come mediana e range interquartile

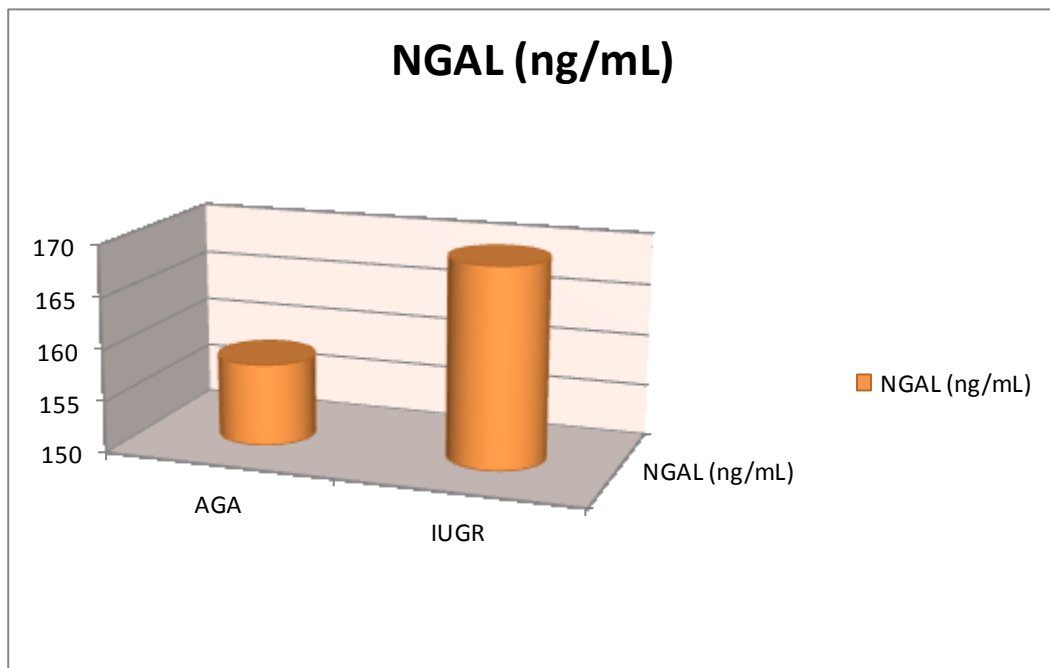


**Figure 2. Rapporto ACR (mg/g), confronto tra i tre gruppi**

Nel confronto infine tra i 3 gruppi, il marcatore urinario NGAL risultava statisticamente differente nel gruppo IUGR ( $169,3 \pm 46,26$  ng/mL) verso il gruppo AGA ( $158 \pm 25,3$  ng/mL,  $p < 0,05$ ), mentre tra il gruppo SGA ( $128,4 \pm 45,29$  ng/mL) ed AGA non si denotano differenze di concentrazione ( $p = 0,28$ ) (Figura 3, Tabella IV)

Non esistevano differenze significative in merito alla concentrazione di sodio, potassio e cloro.

**Figura 3. Concentrazioni di NGAL nei gruppi A (IUGR) e C (AGA)**

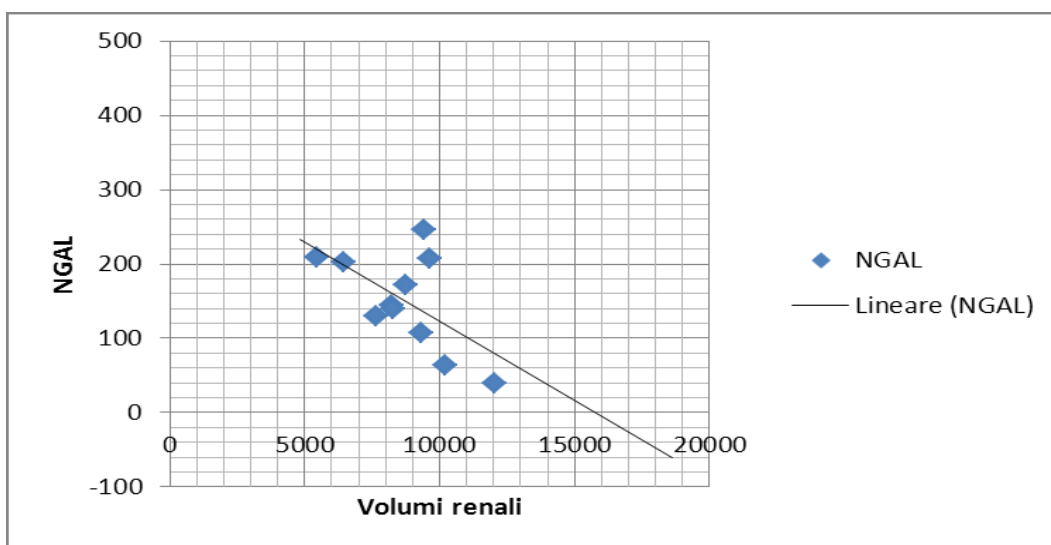


**Tabella IV. NGAL e concentrazioni ioniche**

	IUGR	SGA	AGA	P-Value
<b>NGAL (ng/mL)</b>	<b>169,3 (±46,26)</b>	<b>127,4 (±45,29)</b>	<b>158 (±25,3)</b>	<b>&lt;0,05</b>
<b>Potassio</b>	6,23 (±3,16)	5,05 (±0,88)	5,24 (±1,59)	0,21
<b>Sodio</b>	127,53(±5,62)	128,37 (±4,89)	129,87 (±9,87)	0,11
<b>Cloro</b>	103,61 (±4,73)	102,54 (±4,66)	104,51 (±8,94)	0,12

Dati espressi come media e deviazione standard

Esiste infine una correlazione statisticamente significativa tra NGAL e volumi renali fetali; all'aumentare infatti delle concentrazioni di NGAL corrisponde una riduzione dei volumi renali fetali nel gruppo con ritardo di crescita ( $p=0,05$ ) (figura 6).



**Figura 6. Correlazione tra NGAL e volumi renali.**

## DISCUSSIONE

Il modello naturale di ritardo di crescita, definito da un peso stimato fetale inferiore al 10° centile e un indice di pulsatilità dell'arteria ombelicale maggiore di due deviazioni standard, rappresentato dalla gravidanza gemellare, e la presenza di segni preclinici di danno renale, quali microalbuminuria e maggiore concentrazione di NGAL, ha mostrato, per la prima volta, che questi parametri si associano ad un maggior rischio in utero di aterosclerosi preclinica e glomerulosclerosi. Una precoce disfunzione endoteliale e un ispessimento intimale potrebbero contribuire in modo significativo al prematuro irrigidimento dei vasi arteriosi, che predisporrebbero l'individuo ad un maggiore rischio ipertensivo e cardiovascolare nel corso della vita adulta<sup>80,121-124</sup>. Attualmente risulta possibile, grazie alla moderna ultrasonografia, misurare *in vivo* lo spessore della parete aortica nel corso della vita fetale e della prima infanzia, utilizzando un metodo accurato e riproducibile<sup>125</sup>. Nell'ambito del ritardo di crescita l'aIMT si è dimostrato infatti un sensibile marker di danno endoteliale, supportando l'idea di un'associazione esistente tra ridotta crescita fetale e patologie cardiovascolari in età adulta<sup>71</sup>. Dopo la formulazione da parte di Barker<sup>125</sup> di questa ipotesi relativa alla programmazione fetale, Skilton<sup>78</sup> verificò la presenza di un aumento dello spessore intima medio nei neonati IUGR. Crispi et al<sup>126</sup> descrissero quindi in bambini IUGR un rimodellamento cardiaco con ridotta funzionalità ventricolare, un aumento della pressione arteriosa ed un incremento dello spessore IMT a livello carotideo, evidenziando un incremento lineare in relazione alla severità del danno. Al contrario degli studi precedentemente citati, la nostra attenzione è stata rivolta alla vita intrauterina, nel corso del secondo-terzo trimestre di gravidanza, mostrando un incremento dello spessore aortico IMT sia in utero che a 18 mesi di vita.

I reni in continuo sviluppo sembrano essere estremamente suscettibili al ritardo di crescita, e si presentano spesso di volume ridotto rispetto al peso corporeo totale<sup>89,127</sup>. In accordo con l'ipotesi dell'iperfiltrazione proposta da Brenner<sup>89</sup> un ridotto volume

potrebbe condurre ad ipertensione ed ipertrofia glomerulare, a loro volta responsabili di ipertensione sistemica, aumentato riassorbimento sodico e danno glomerulare, con conseguente albuminuria e glomerulosclerosi<sup>127-128</sup>. La microalbuminuria rappresenta un marker precoce di danno renale a causa di un'alterata permeabilità glomerulare alle proteine, e risulta in grado di predire il rischio di mortalità cardiovascolare e non<sup>90,129</sup>. La presenza di alti livelli di microalbuminuria amniotica a carico dei feti gemelli IUGR con alterazioni flussimetriche potrebbe avere implicazioni pediatriche e nel corso della vita adulta. La valutazione della funzionalità renale in questa categoria di pazienti è stata nell'ultimo decennio oggetto di studio. Singh e Hoy<sup>129</sup> descrissero un'associazione tra basso peso alla nascita, dimensioni dei reni e livelli di albuminuria negli Aborigeni Australiani con un'età compresa tra 4 e 72 anni di vita. Recentemente quindi, Keijzer-Veen et al<sup>130</sup> nell'ambito di un follow up prospettico, riportarono un'associazione tra severità del ritardo e funzionalità renale in giovani adulti nati prematuramente. Una meta-analisi pubblicata da Teeninga<sup>131</sup> mostrava che il basso peso presenta un'importante influenza sul tasso di filtrazione glomerulare e proteinuria, e che si associava ad un elevato rischio di sviluppare severe complicanze, inclusa l'ipertensione.

Sebbene i meccanismi che stanno alla base di queste associazioni rimangano non del tutto chiare, questi risultati rappresentano un altro tassello nella comprensione del ritardo di crescita. Ulteriori studi dovrebbero focalizzarsi su fattori addizionali che incidano sulla precoce disfunzione endoteliale, in aggiunta a segni di insufficienza placentare e vasculopatia dell'arteria ombelicale.

In particolare esiste un crescente interesse volto allo studio di podociti e cellule endoteliali, accumulate dalla medesima origine embriologica mesenchimale. L'albuminuria è uno dei primi segni di danno renale che anticipa la comparsa di un ridotto tasso di filtrazione glomerulare. In presenza di danno renale l'assorbimento di albumina è ridotto ed aumenta la sua concentrazione nel liquido amniotico. La maggior

fonte di liquido amniotico è l'urina fetale, assieme al polmone fetale, mentre il passaggio trans-membrana risulta di secondaria importanza. Il liquido amniotico rappresenta quindi il prodotto della filtrazione renale fetale. Un progressivo deterioramento dell'equilibrio acido-base e delle condizioni vascolari fetali possono portare a una progressiva riduzione del liquido amniotico ed una sua alterata composizione<sup>125</sup>. Nonostante tuttavia queste osservazioni, rimane ancora da chiarire se l'albumina o il rapporto ACR del liquido amniotico siano in grado di evidenziare un problema renale in feti gemelli IUGR, come invece le urine nel corso dell'infanzia o della vita adulta<sup>130</sup>.

Dal nostro studio è emerso che nei feti IUGR la concentrazione urinaria di NGAL è risultata maggiore rispetto a quella dei feti AGA e SGA. Inoltre nello stesso gruppo di feti si è riscontrata una correlazione negativa tra livelli urinari di NGAL e volumi renali fetali. Questo dato sembrerebbe confermare la tesi secondo la quale NGAL rivestirebbe un ruolo di marker precoce di danno renale, supportato in questo caso dal ritardo di crescita e da una ridistribuzione della circolazione fetale a vantaggio degli organi nobili<sup>101</sup>.

Ci sono alcune limitazioni relative a questo studio. In primis, indagini trasversali non consentono di dare indicazioni su come monitorizzare feti singoli o gemelli non ancora compromessi. Secondo, non possiamo ancora stabilire se vi sia un peggioramento progressivo con l'epoca gestazionale in parallelo allo spessore intima media aortico. Non è noto se lo screening per albuminuria e aIMT potrebbero prevenire l'insufficienza renale, l'aterosclerosi, e la sindrome metabolica in fase iniziale.

In conclusione, questo studio mostra per la prima volta che lo spessore aIMT, l'albuminuria e l'NGAL in utero risultano maggiori nei feti IUGR con alterazioni flussimetriche rispetto a quelli IUGR con Doppler normale o AGA. Sebbene l'esatto meccanismo che sottende queste associazioni non sia del tutto chiaro, questi dati indicanti un precoce danno glomerulare nell'ambito delle gravidanze gemellari, si



aggiungono a quanto avevamo già trovato in merito all'aIMT ed alla glomerulosclerosi in feti e bambini singoli.

Ulteriori studi di follow up sono necessari per confermare il ruolo prognostico di questi markers nello sviluppo di queste patologie.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Panico S, Mattiello A. Epidemiology of cardiovascular diseases in women in Europe. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2010;20:379-85.
2. Capewell S, Ford ES, Croft JB, Critchley JA, Greenlund KJ, Labarthe DR. Cardiovascular risk factor trends and potential for reducing coronary heart disease mortality in the United States of America. *Bull World Health Organ* 2010;88:120-30.
3. EUROCISS. European cardiovascular surveillance set. *Eur Cardiovascular Prev Rehabil* 2007, Dec;14(Suppl.3).
4. US Department of Health and Human Services. Healthy People 2010: Understanding and improving health. DHHS 2000.
5. Woolf B. Studies on infant mortality--Part II. Social aetiology of stillbirths and infant deaths in county boroughs of England and Wales. *J Epidemiol Community Health* 1996;50:613-9.
6. Barker DJ. The developmental origins of well-being. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2004;359:1359-66.
7. Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* 1989;2:577-80.
8. West-Eberhard MJ. Phenotype plasticity and the origins of diversity. *Ann Rev Ecol Syst* 1989;20:249-78.
9. Mellanby E. Nutrition and child-bearing. *Lancet* 1933;Volume 222, Issue 5751:1131-7.

10. Barker DJP. Mothers, Babies and Health in Later Life. Churchill Livingstone, 1998.
11. Harding JE. The nutritional basis of the fetal origins of adult disease. *Int J Epidemiol* 2001;30:15-23.
12. Kwong WY, Wild AE, Roberts P, Willis AC, Fleming TP. Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension. *Development* 2000;127:4195-202.
13. McMillen IC, Robinson JS. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev* 2005;85:571-633.
14. Eriksson JG, Forsen TJ, Osmond C, Barker DJ. Pathways of infant and childhood growth that lead to type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2003;26:3006-10.
15. Keller G, Zimmer G, Mall G, Ritz E, Amann K. Nephron number in patients with primary hypertension. *N Engl J Med* 2003;348:101-8.
16. Vo T, Hardy DB. Molecular mechanisms underlying the fetal programming of adult disease. *J Cell Commun Signal* 2012;6:139-53.
17. Flavahan NA, Vanhoutte PM. Endothelial cell signaling and endothelial dysfunction. *Am J Hypertens* 1995;8:28S-41S.
18. Chatterjee A, Black SM, Catravas JD. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. *Vascul Pharmacol* 2008;49:134-40.
19. Feletou M, Tang EH, Vanhoutte PM. Nitric oxide the gatekeeper of endothelial vasomotor control. *Front Biosci* 2008;13:4198-217.

20. Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, et al. Tetrahydrobiopterin enhances forearm vascular response to acetylcholine in both normotensive and hypertensive individuals. *Am J Hypertens* 2002;15:326-32.
21. Sessa WC. Regulation of endothelial derived nitric oxide in health and disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005;100 Suppl 1:15-8.
22. Mudau M, Genis A, Lochner A, Strijdom H. Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis. *Cardiovasc J Afr* 2012;23:222-31.
23. Barker DJ, Forsen T, Uutela A, Osmond C, Eriksson JG. Size at birth and resilience to effects of poor living conditions in adult life: longitudinal study. *BMJ* 2001;323:1273-6.
24. Bateson P, Bateson PPG, Martin PR. Design for a life: How behaviour develops. Vintage, 1999.
25. Barker DJ, Eriksson JG, Forsen T, Osmond C. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *Int J Epidemiol* 2002;31:1235-9.
26. Development of a strategy towards promoting optimal fetal growth. World Health Organization. (at [http://www.who.int/nutrition/topics/lbw\\_strategy\\_background.pdf](http://www.who.int/nutrition/topics/lbw_strategy_background.pdf)).
27. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention. Prevalence of Obesity Among U.S. Children and Adolescents (Aged 2-19 Years)—National Health and Nutrition Examination Surveys, NHANES (1976-1980 and 2003-2006). 2009.
28. American College of Obstetricians and Gynecologists. ACOG Practice bulletin no. 134: fetal growth restriction. *Obstet Gynecol* 2013;121:1122-33.

29. Gardosi J, Mul T, Mongelli M, Fagan D. Analysis of birthweight and gestational age in antepartum stillbirths. *Br J Obstet Gynaecol* 1998;105:524-30.
30. American College of Obstetricians and Gynecologists. Intrauterine growth restriction. Washington, DC: American College of Obstetricians and Gynecologists 2000.
31. Royal College of Obstetricians and Gynecologists. The investigation and management of the small-for-gestational-age fetus (guideline no. 31). London: Royal College of Obstetricians and Gynecologists 2002.
32. Baschat AA, Cosmi E, Bilardo CM, et al. Predictors of neonatal outcome in early-onset placental dysfunction. *Obstet Gynecol* 2007;109:253-61.
33. Turan OM, Turan S, Gungor S, et al. Progression of Doppler abnormalities in intrauterine growth restriction. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008;32:160-7.
34. Baschat AA. Fetal growth restriction - from observation to intervention. *J Perinat Med* 2010;38:239-46.
35. Unterscheider J, Daly S, Geary MP, et al. Optimizing the definition of intrauterine growth restriction: the multicenter prospective PORTO Study. *Am J Obstet Gynecol* 2013;208:290.e1,290.e6.
36. Anderson CM, Lopez F, Zimmer A, Benoit JN. Placental insufficiency leads to developmental hypertension and mesenteric artery dysfunction in two generations of Sprague-Dawley rat offspring. *Biol Reprod* 2006;74:538-44.
37. Waterland RA, Jirtle RL. Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. *Nutrition* 2004;20:63-8.

38. Oommen AM, Griffin JB, Sarath G, Zemleni J. Roles for nutrients in epigenetic events. *J Nutr Biochem* 2005;16:74-7.
39. Gennser G, Rymark P, Isberg PE. Low birth weight and risk of high blood pressure in adulthood. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1988;296:1498-500.
40. Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Salvetti A. The role of endothelium in human hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1998;7:203-9
41. Baum M. Role of the kidney in the prenatal and early postnatal programming of hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010;298:F235-47.
42. Santos MS, Joles JA. Early determinants of cardiovascular disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2012;26:581-97.
43. Nuyt AM. Mechanisms underlying developmental programming of elevated blood pressure and vascular dysfunction: evidence from human studies and experimental animal models. *Clin Sci (Lond)* 2008;114:1-17.
44. Nuyt AM, Alexander BT. Developmental programming and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2009;18:144-52.
45. Minshall RD, Tiruppathi C, Vogel SM, Malik AB. Vesicle formation and trafficking in endothelial cells and regulation of endothelial barrier function. *Histochem Cell Biol* 2002;117:105-12.
46. Minshall RD, Malik AB. Transport across the endothelium: regulation of endothelial permeability. *Handb Exp Pharmacol* 2006;(176 Pt 1):107-44.

47. Levick JR. Fluid exchange across endothelium. *Int J Microcirc Clin Exp* 1997;17:241-7.
48. Martin FA, Murphy RP, Cummins PM. Thrombomodulin and the vascular endothelium: insights into functional, regulatory, and therapeutic aspects. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013;304:H1585-97.
49. Real C, Caiado F, Dias S. Endothelial progenitors in vascular repair and angiogenesis: how many are needed and what to do? *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2008;8:185-93.
50. Vanhoutte PM. Endothelium and control of vascular function. State of the Art lecture. *Hypertension* 1989;13:658-67.
51. Thompson LP. Effects of chronic hypoxia on fetal coronary responses. *High Alt Med Biol* 2003;4:215-24.
52. Li G, Xiao Y, Estrella JL, Ducsay CA, Gilbert RD, Zhang L. Effect of fetal hypoxia on heart susceptibility to ischemia and reperfusion injury in the adult rat. *J Soc Gynecol Investig* 2003;10:265-74.
53. Hales CN, Barker DJ, Clark PM, et al. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ* 1991;303:1019-22.
54. Petrik J, Reusens B, Arany E, et al. A low protein diet alters the balance of islet cell replication and apoptosis in the fetal and neonatal rat and is associated with a reduced pancreatic expression of insulin-like growth factor-II. *Endocrinology* 1999;140:4861-73.

55. Rizzo G, Capponi A, Cavicchioni O, Vendola M, Arduini D. Low cardiac output to the placenta: an early hemodynamic adaptive mechanism in intrauterine growth restriction. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008;32:155-9.
56. Al-Ghazali W, Chita SK, Chapman MG, Allan LD. Evidence of redistribution of cardiac output in asymmetrical growth retardation. *Br J Obstet Gynaecol* 1989;96:697-704.
57. Garg M, Thamotharan M, Dai Y, et al. Glucose intolerance and lipid metabolic adaptations in response to intrauterine and postnatal calorie restriction in male adult rats. *Endocrinology* 2013;154:102-13.
58. Blondel B, Kaminski M. Trends in the occurrence, determinants, and consequences of multiple births. *Semin Perinatol* 2002; 26(4): 239-249.
59. Gratacos E, Lewi L, Munoz B et al. A classification system for selective intrauterine in monochorionic pregnancies according to umbilical artery Doppler flow in the smaller twin. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2007; 30:28-34.
60. Multiple pregnancy. The management of twin and triplet pregnancies in the antenatal period. Nice guideline, 2009.
61. Muhlhusler Beverly S, Hancock Serina N, Bloomfield Frank H, Harding Richard. Are twins growth restricted? *Pediatric Research*. *Pediat Res* 2011 Aug 70(2)
62. Multiple pregnancy. The management of twin and triplet pregnancies in the antenatal period. Nice guideline, 2009.
63. Phillips DI, Davies MJ, Robinson JS. Fetal growth and the fetal origins hypothesis in twins-problems and perspective. *Twin Res* 2001;4: 327-31.



64. Visentin S, Grisan E, Zanardo V, Bertin M, Veronese E, Cavallin F, Ambrosini G, Trevisanuto D, Cosmi E. Developmental programming of cardiovascular risk in intrauterine growth-restricted twin fetuses according to aortic intima thickness. *J Ultrasound Med*. 2013 Feb;32(2):279-84.
65. McGill HC, Jr, McMahan CA, Herderick EE, Malcom GT, Tracy RE, Strong JP. Origin of atherosclerosis in childhood and adolescence. *Am J Clin Nutr* 2000;72:1307S-15S.
66. Lorenz MW, Markus HS, Bots ML, Rosvall M, Sitzer M. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. *Circulation* 2007;115:459-67.
67. Rich-Edwards JW, Stampfer MJ, Manson JE, et al. Birth weight and risk of cardiovascular disease in a cohort of women followed up since 1976. *BMJ* 1997;315:396-400.
68. Eriksson JG, Forsen T, Tuomilehto J, Osmond C, Barker DJ. Early growth and coronary heart disease in later life: longitudinal study. *BMJ* 2001;322:949-53.
69. Levitt NS, Lambert EV, Woods D, Hales CN, Andrew R, Seckl JR. Impaired glucose tolerance and elevated blood pressure in low birth weight, nonobese, young south african adults: early programming of cortisol axis. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:4611-8.
70. Rich-Edwards JW, Kleinman K, Michels KB, et al. Longitudinal study of birth weight and adult body mass index in predicting risk of coronary heart disease and stroke in women. *BMJ* 2005;330:1115.

71. Koklu E, Kurtoglu S, Akcokus M, et al. Increased aortic intima-media thickness is related to lipid profile in newborns with intrauterine growth restriction. *Horm Res* 2006;65:269-75.
72. Raitakari OT. Imaging of subclinical atherosclerosis in children and young adults. *Ann Med* 1999;31 Suppl 1:33-40.
73. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis. *Mech Ageing Dev* 1979;9:435-40.
74. Meyer WW, Lind J, Yao AC, Kauffman SL. Early arterial lesions in infancy and childhood and ways of prevention. *Paediatrician* 1982;11:136-56.
75. Lo Vasco VR, Salmaso R, Zanardo V, et al. Fetal aorta wall inflammation in ultrasound-detected aortic intima/media thickness and growth retardation. *J Reprod Immunol* 2011;91:103-7.
76. Lo Vasco VR, Cosmi E, Visentin S, et al. IL-1beta and IL-23 in amniotic fluids of ultrasound-detected aortic intima/media thickness and growth retardation. *J Reprod Immunol* 2012;93:64-7.
77. Koklu E, Kurtoglu S, Akcokus M, Yikilmaz A, Coskun A, Gunes T. Intima-media thickness of the abdominal aorta of neonate with different gestational ages. *J Clin Ultrasound* 2007;35:491-7.
78. Skilton MR, Evans N, Griffiths KA, Harmer JA, Celermajer DS. Aortic wall thickness in newborns with intrauterine growth restriction. *Lancet* 2005;365:1484-6.
79. Cosmi E, Visentin S, Fanelli T, Mautone AJ, Zanardo V. Aortic intima media thickness in fetuses and children with intrauterine growth restriction. *Obstet Gynecol* 2009;114:1109-14.

80. Jarvisalo MJ, Jartti L, Nanto-Salonen K, et al. Increased aortic intima-media thickness: a marker of preclinical atherosclerosis in high-risk children. *Circulation* 2001;104:2943-7.
81. Visentin S, Grisan E, Zanardo V, et al. Developmental programming of cardiovascular risk in intrauterine growth-restricted twin fetuses according to aortic intima thickness. *J Ultrasound Med* 2013;32:279-84.
82. Cecconi D, Lonardoni F, Favretto D, et al. Changes in amniotic fluid and umbilical cord serum proteomic profiles of foetuses with intrauterine growth retardation. *Electrophoresis* 2011;32:3630-7.
83. Favretto D, Cosmi E, Ragazzi E, et al. Cord blood metabolomic profiling in intrauterine growth restriction. *Anal Bioanal Chem* 2012;402:1109-21.
84. Spijkers LJ, van den Akker RF, Janssen BJ, et al. Hypertension is associated with marked alterations in sphingolipid biology: a potential role for ceramide. *PLoS One* 2011;6:e21817.
85. Fenger M, Linneberg A, Jorgensen T, et al. Genetics of the ceramide/sphingosine-1-phosphate rheostat in blood pressure regulation and hypertension. *BMC Genet* 2011;12:44,2156-12-44.
86. Franco MC, Christofalo DM, Sawaya AL, Ajzen SA, Sesso R. Effects of low birth weight in 8- to 13-year-old children: implications in endothelial function and uric acid levels. *Hypertension* 2006;48:45-50.

87. Schreuder MF, Nyengaard JR, Fodor M, van Wijk JA, Delemarre-van de Waal HA. Glomerular number and function are influenced by spontaneous and induced low birth weight in rats. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:2913-9.
88. Manalich R, Reyes L, Herrera M, Melendi C, Fundora I. Relationship between weight at birth and the number and size of renal glomeruli in humans: a histomorphometric study. *Kidney Int* 2000;58:770-3.
89. Brenner BM, Lawler EV, Mackenzie HS. The hyperfiltration theory: a paradigm shift in nephrology. *Kidney Int* 1996;49:1774-7.
90. Keijzer-Veen MG, Schrevel M, Finken MJ, et al. Microalbuminuria and lower glomerular filtration rate at young adult age in subjects born very premature and after intrauterine growth retardation. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:2762-8.
91. Chalouhi GE, Stirnemann JJ, Salomon LJ, Essaoui M, Quibel T, Ville Y. Specific complications of monochorionic twin pregnancies: twin-twin transfusion syndrome and twin reversed arterial perfusion sequence. *Semin Fetal Neonatal Med* 2010;15:349-56.
92. Valle A, Bottino S, Meregalli V, Zanini A: *Manuale di sala parto*. Edi.Ermes. 2006; pp 140-152.
93. Kjeldsen L, Bainton DF, Sengelov H, Borregaard N. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel matrix protein of specific granules in human neutrophils. *Blood* 1994; 83:799–807.

94. Wang Y, Lam KSL, Kraegen EW, Sweeney G, Zhang J, Tso AWK et al. Lipocalin-2 is an inflammatory marker closely associated with obesity, insulin resistance and hyperglycemia in humans. *Clin Chem* 2007; 53: 34–41.
95. Zanardo V, Fanelli T, Weiner G, Fanos V, Zaninotto M, Visentin S, Cavallin F, Trevisanuto D, Cosmi E. Intrauterine growth restriction is associated with persistent aortic wall thickening and glomerular proteinuria during infancy. *Kidney Int.* 2011 Jul;80(1):119-23
96. David J. Askenazi, Rajesh Koralkar, Emily B. Levitan, Stuart L. Goldstein, Prasad Devarajan, Srikrishna Khandrika, Ravindra L. Mehta, and Namasivayam Ambalavanan. Baseline Values of Candidate Urine Acute Kidney Injury Biomarkers Vary by Gestational Age in Premature Infants. *Pediatr Res* 70: 302–306, 2011.
97. Cowland JB, Sorensen OE, Sehested M, Borregaard N. Neutrophilgelatinase-associated lipocalin is up-regulated in human epithelial cells by IL-1b, but not by TNF-a. *J Immunol* 2003; 171: 6630–6639.
98. Elneihoum AM, Falke P, Hedblad B, Lindgärde F, Ohlsson K. Leukocyte activation in atherosclerosis: correlation with risk factors. *Atherosclerosis* 1997; 131: 79–84.
99. Hemdahl A-L, Gabrielsen A, Zhu C, Eriksson P, Hedin U, Kastrup J et al. Expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in atherosclerosis and myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 136–142.

100. Anja Urbschat<sup>1</sup>, Nicholas Obermüller and Axel Haferkamp. Biomarkers of kidney injury. *Biomarkers*, 2011; 16(S1): S22–S30
101. Haase M, Bellomo R, Devarajan P, Schlattmann P, Haase-Fielitz A; NGAL Meta-analysis Investigator Group. (2009). Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis* 54:1012–1024.
102. Goldstein SL 2007 Kidney function assessment in the critically ill child: is it time to leave creatinine behind? *Crit Care* 11:141
103. Parikh CR, Devarajan P 2008 New biomarkers of acute kidney injury. *Crit Care Med* 36:S159–S165
104. Devarajan P 2008 Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): a new marker of kidney disease. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 241:89–94
105. Schmidt-Ott KM, Mori K, Kalandadze A, Li JY, Paragas N, Nicholas T, Devarajan P, Barasch J 2006 Neutrophil gelatinase-associated lipocalin-mediated iron traffic in kidney epithelia. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 15:442–449
106. Schmidt-Ott KM, Mori K, Li JY, Kalandadze A, Cohen DJ, Devarajan P, Barasch J 2007 Dual action of neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J Am Soc Nephrol* 18:407–413

107. Mishra J, Ma Q, Prada A, Mitsnefes M, Zahedi K, Yang J, Barasch J, Devarajan P 2003 Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol* 14:2534–2543
108. Devarajan P, Mishra J, Supavekin S, Patterson LT, Steven Potter S 2003 Gene expression in early ischemic renal injury: clues towards pathogenesis, biomarker discovery, and novel therapeutics. *Mol Genet Metab* 80:365–376
109. Mishra J, Mori K, Ma Q, Kelly C, Barasch J, Devarajan P 2004 Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a novel early urinary biomarker for cisplatin nephrotoxicity. *Am J Nephrol* 24:307–315
110. Menzel S and Moeller MJ. Review: Role of the podocyte in proteinuria. *Pediatric Nephrology*. DOI 10.1007/s00467-010-1725-5.
- 111 Adrian P. Lavery, Jareen K. Meinzen-Derr, Edward Anderson, Qing Ma, Michael R. Bennett, Prasad Devarajan, and Kurt R. Schibler. Urinary ngal in premature infants. *Pediatr Res* 64: 423–428, 2008.
112. David J. Askenazi, MD, MSPH, Angela Montesanti, MPH, Hayden Hunley, MPH, Rajesh Koralkar, MPH, MBBS, Pushkar Pawar, MBBS, MPH, Faisal Shuaib, MD, MPH, Amandiy Liwo, MD, Prasad Devarajan, MD, and Namasivayam Ambalavanan, MD. Urine Biomarkers Predict Acute Kidney Injury and Mortality in Very Low Birth Weight Infants. *J Pediatr* 2011;159:907-12

113. Michele Mussap, Roberta Degrandi, Marco Fravega, Vassilios Fanos. Acute kidney injury in critically ill infants: the role of urine Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL). *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, October 2010; 23(S3): 70–72
114. Gaetano La Manna, Silvia Galletti, Irene Capelli, Silvia Vandini, Katia Nisi, Giulia Aquilano, Rita Mancini, Elisa Carretta, Giovanni Montini, Giacomo Faldella, And Sergio Stefoni. Urinary Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin at Birth Predicts Early Renal Function in Very Low Birth Weight Infants. *Pediatr Res* 70: 379–383, 2011.
115. Mallbris L, O'Brien KP, Hulthe'n A, Sandstedt B, Cowland JB, Borregaard N, Ståhle-Bäckdahl M. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a marker for dysregulated keratinocyte differentiation in human skin. *Exp Dermatol* 2002; 11: 584–591.
116. Tadesse S, Luo G, Park JS, Kim BJ, Snegovskikh VV, Zheng T, Hodgson EJ, Arcuri F, Toti P, Parikh CR, Guller S, Norwitz ER. Intra-amniotic infection upregulates neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) expression at the maternal-fetal interface at term: implications for infection-related preterm birth *Reprod Sci*. 2011 Aug;18(8):713-22.
117. Palinski W., Yamashita T. et al. Developmental programming. Maternal hypercholesterolemia and immunity influence susceptibility to atherosclerosis. *Nutr Rev* 2007 Dec;65(12 Pt 2):S182-7



118. Johansson S, Iliadou A, Bergvall N, Tuvemo T, Norman M, Cnattingius S. Risk of high blood pressure among young men increases with the degree of immaturity at birth. *Circulation* 2005;112:3430-6.
119. Zanardo V, Visentin S, Trevisanuto D, Bertin M, Cavallin F, Cosmi E. Fetal aortic wall thickness: a marker of hypertension in IUGR children? *Hypertens Res* 2013;36:440-3.
120. Comas M, Crispi F, Cruz-Martinez R, Figueras F, Gratacos E. Tissue Doppler echocardiographic markers of cardiac dysfunction in small-for-gestational age fetuses. *Am J Obstet Gynecol* 2011;205:57.e1,57.e6.
121. Levine, R. S., Hennekens, C. H., & Jesse, M. J. Blood pressure in prospective population based cohort of new-born and infant twins. *BMJ*, 1994, 308, 298–302.
122. Loos, R. J., Fagard, R., Beunen, G., Derom, C., & Lietinck, R. Birth weight and blood pressure in young adults: A prospective twin study. *Circulation*, 2001, 104, 1633–1638.
123. Litwin, M., & Niemirska, A. Intima-media thickness measurements in children with cardiovascular risk factors. *Pediatric Nephrology*, 2009; 24, 707–719.
124. Zhang, J., Brenner, R. A., & Klebanoff, M. A. Differences in birth weight and blood pressure at age 7 years among twins. *American Journal of Epidemiology*, 2001, 153, 779–782.
125. Baschat, A. A. Fetal response to placental insufficiency: An update. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 2004, 111, 1031–1041.

126. Crispi, F., Bijmens, B., Figueras, F., Le Noble, F., Ahmed, A., Gratacos, E. (2010). Fetal growth restriction results in remodeled and less efficient hearts in children. *Circulation*, 2010; 121, 2427–2436.
127. Luyckx, V., & Brenner, B. Low birth weight, nephron number, and kidney disease. *Kidney International*, 2005; 68, 68–77.
128. Brenner, B. M., Lawler, E. V., & Mackenzie, H. S. (1998). The hyperfiltration theory: A paradigm shift in nephrology. *Kidney International*, 49, 1774–1777.
129. Singh, G. R., & Hoy, W. E. Kidney volume, blood pressure, and albuminuria: Findings in an Australian aboriginal community. *American Journal of Kidney Diseases*, 43, 2004; 500 254–259.
130. Crews, D. C., Boulware, L. E., Gansevoort, R. T., & Jaar, B. G. Albuminuria: Is it time to screen the general population? *Advances in Chronic Kidney Disease*, 2011, 18, 249–257.
131. Teeninga, N., Schreuder, M. F., Bokenkamp, A., Delemarre-van deWaal, H. A., & vanWijk, J. A. Influence of low birth weight on minimal change nephrotic syndrome in children, including a meta-analysis. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2008; 23, 1615–1620.

## ***Ringraziamenti***

*Dedico questa tesi e questo percorso formativo a tutti coloro che hanno saputo sostenermi, credere nel mio entusiasmo e nel mio amore per la ricerca, in primis alla mia famiglia, ai più cari amici, al Prof. Marchesoni, che mi ha accolto con affetto, al Dott. Cosmi, che mi ha dato la possibilità di essere quella che sono, ai professori e colleghi di Dottorato, al Dipartimento di Ostetricia e Ginecologia di Padova dal quale provengo, ed infine a me stessa.*

